

Universidad de Panamá
Vicerrectoría de Investigación y Postgrado
Programa Centroamericano de Maestría en Entomología

Diagnóstico Molecular de *Leishmania sp.* en *Lutzomyia sp.*

Por

Ricardo A. Carrasco G.

**Tesis presentada como requisito para optar por el Título de
Maestro en Ciencias con Especialidad en Entomología Médica.**

Panamá, República de Panamá

2001

65310

adh. del autor

3 ABR 2002

TM

Dedicatoria

Esta tesis la dedico a Dios a mi esposa Evelia y a mi hijo Ricardo Samuel quienes fueron un importante estímulo para culminar mis estudios Al igual que a mis padres Ricardo y Cecilia por su valioso apoyo

Agradecimiento

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la Profesora Argentina de Turner y al Dr Juan Miguel Pascale por sus valiosos y atinados consejos durante la realización de este trabajo así como la confianza que depositaron en mí durante la realización del mismo

Al Sr. Roberto Rojas por compartir conmigo su valiosa e incalculable experiencia profesional

A la Dra Aleida Salazar y al Sr. Lelys Ureña por toda la cooperación brindada durante la realización de mi tesis.

Índices

Índice General

Resumen	1
Capítulo I	
Introducción	3
Capítulo II	
Generalidades	
I Antecedentes	8
II Leishmaniasis en Panamá	10
III Agente Etiológico	11
A Organización genómica del parásito	14
B Taxonomía del parásito	15
IV Reacción en Cadena de la Polimerasa	16
A Amplificación del ADN al azar (RAPD) y restricción de los productos de PCR (PCR-RFLP)	17
V Vectores de Leishmaniasis	19
A Vectores	19
B Metaciclologénesis	22
C Capacidad vectorial	23
VI Reservorios	25
Capítulo III	
Materiales y Métodos	
I Colonización de <i>Lutzomyia gomezi</i>	27
II Sitios de colectas	32

A.	Caracterización del área de Gamboa	32
B	Caracterización del área de Altos de Campana	36
C	Caracterización del área de Santa Clara nº 2	39
III	Métodos de colecta e identificación del material colectado	42
A	Colectas con trampas de luz tipo CDC	42
B	Colectas con cebo humano	46
IV	Identificación de especímenes	46
V	Laboratorio para el desarrollo de la PCR	47
VI	Extracción del ADN de las muestras de <i>Lutzomyia sp</i>	49
VII	Optimización de la PCR para <i>Leishmania sp</i>	51
A	Especificidad de la prueba de PCR	51
B	Sensibilidad de la prueba de PCR	51
C	Amplificación del ADN de <i>Leishmania sp</i>	52
VIII	Preparación del gel de agarosa al 1.5 %	54
IX	Electroforesis de ADN en gel de agarosa	55
X	Visualización de los productos amplificados	55
XI	Confirmación de los productos amplificados	55
XII	PCR-RFLP o restricción de los productos amplificados	58
Capítulo IV		
Resultados		
I	Colonización de <i>Lutzomyia gomezi</i>	61
II	Identificación morfológica de las <i>Lutzomyia sp</i>	61
A.	Áreas de Gamboa y Altos de Campana	61

B	Área de Santa Clara nº 2	63
III	Extracción del ADN de <i>Lutzomyia sp</i> colectadas en el campo	65
IV	Sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR para <i>Leishmania sp</i>	66
V	Evaluación del Método de PCR para la detección de <i>Leishmania sp.</i> en <i>Lutzomyia sp</i> colectadas en el campo	71
VI	Identificación de los productos amplificados por la PCR de <i>Leishmania</i>	73
Capítulo V		
	Discusión	77
Capítulo VI		
	Conclusiones y Recomendaciones	85
	Bibliografía	89

Índice de Fotografías

Foto n° 1	Colecta de <i>Lutzomyia gomezi</i> en el corregimiento de Chilibre utilizadas en el levantamiento de la colonia 30
Foto n° 2	Envase de cría de <i>Lutzomyia gomezi</i> y jaula utilizada en la alimentación de los insectos adultos de la colonia. 31
Foto n° 3-4	Vista panorámica de los sitios de colecta utilizados por el personal del Instituto conmemorativo Gorgas en las colectas de adultos de <i>Lutzomyia sp.</i> en el área de Gamboa 34
Foto n° 5-6	Vista panorámica de los sitios de colecta utilizados por el personal del Instituto Conmemorativo Gorgas en las colectas de adultos de <i>Lutzomyia sp.</i> en el área de Altos de Campana 37
Foto n° 7-8	Vista panorámica del área de colecta en la comunidad de Santa Clara n° 2 (Arraján) 40
Foto n° 9-10	Trampas CDC con bloques de CO ₂ (hielo seco) utilizadas en las colectas de <i>Lutzomyia sp</i> en comunidad de Santa Clara n° 2 (Arraján) 45
Foto n° 11	Sistema utilizado para la maceración de los grupos de <i>Lutzomyia sp</i> consistente en un tubo cónico de 1.5 ml y un pequeño dispositivo para macerar (pestle) 50
Foto n° 12	Fuente de poder y cámara para electroforesis utilizada en la separación de los productos amplificados 56

Foto n° 13	Transiluminador de luz ultravioleta utilizado en la visualización de los fragmentos de ADN	56
Foto n° 14	Termociclador utilizado en la amplificación del ADN de las muestras de <i>Lutzomyia sp</i>	57
Foto n° 15	Área utilizada para la amplificación del ADN de <i>Leishmania sp</i> en donde se observa la campana de flujo laminar y el termociclador empleado en este procedimiento	57
Foto n° 16	Evaluación del método de extracción de ADN a <i>Lutzomyia sp</i> mediante electroforesis en gel de agarosa.	65
Foto n° 17	Electroforesis en gel de agarosa para PCR- <i>Leishmania</i>	68
Foto n° 18	Electroforesis en gel de agarosa para PCR- <i>Leishmania</i>	69
Foto n° 19	Electroforesis en gel de agarosa para PCR- <i>Leishmania</i> . Sensibilidad de la reacción de PCR con los iniciadores <i>Leish1</i> y <i>Leish2</i> utilizando diluciones del ADN de <i>Leishmania panamensis</i> ..	70
Foto n° 20	Electroforesis en gel de agarosa para PCR- <i>Leishmania</i> (MPM, marcador de peso molecular), (C-, control negativo), (C+; control positivo), (P-76 y P-82; grupo de <i>Lutzomyia</i> 76 y 82)	72
Foto n° 21	Electroforesis en gel de agarosa para PCR- <i>Leishmania</i> (M; marcador de peso molecular), (C-, control negativo), (C+, control positivo), (P-92, grupo de <i>Lutzomyia</i> 92).	72
Foto n° 22	Análisis de los fragmentos amplificados por la PCR para <i>Leishmania sp</i> con electroforesis en gel de agarosa	73

Foto n° 23	Análisis de los fragmentos amplificados por la PCR de <i>Leishmania sp</i> con electroforesis en gel de poliacrilamida	74
Foto n° 24-25	Identificación de <i>Leishmania sp</i> por PCR-RFLP en muestras de <i>Lutzomyia sp</i> colectadas en el campo	76

Índice de Cuadros

Cuadro n° 1	<i>Lutzomyia sp</i> colectadas en Gamboa.	62
Cuadro n° 2	<i>Lutzomyia sp</i> colectadas en Altos de Campana.	62
Cuadro n° 3	Especies coletadas en el área de Santa Clara n° 2 contra método de colecta.	64
Cuadro n° 4	<i>Lutzomyia sp</i> colectadas en Santa Clara n° 2	64
Cuadro n° 5	Sensibilidad de la PCR para <i>Leishmania sp</i> utilizando <i>L panamensis</i>	66
Cuadro n° 6	Especificidad de la prueba de PCR para <i>Leishmania</i> con los iniciadores Leish1 y Leish2	67
Cuadro n° 7	Resultados de la PCR-RFLP	75

Índice de Gráficas y Mapas

Mapas

Mapa n° 1	Área de estudio Gamboa	35
Mapa n° 2	Parque Nacional Altos de Campana.	38
Mapa n° 3	Puntos de Captura de <i>Lutzomyia sp</i> en Santa Clara de Arraján.	44

Gráficas

Gráfica n° 1	Casos de Leishmaniasis. Rep de Panamá, años. 1990 - 2000	41
---------------------	--	-------	-----------

Resumen

En Panamá la leishmaniasis es básicamente una zoonosis de animales forestales, la cual está presente en áreas boscosas y montañosas de casi todo el país. La detección del agente etiológico en el vector y la posterior identificación de la especie es un trabajo arduo y que requiere de personal altamente capacitado y con mucha experiencia.

El propósito del presente trabajo fue el de optimizar y validar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa como una herramienta de diagnóstico de *Leishmania sp* en *Lutzomyia sp*

Se aplicó la técnica a *Lutzomyias* colectadas en tres áreas de la República de Panamá (Gamboa, Altos de Campana y Santa Clara n° 2), procesándose un total de 103 grupos de trabajos formada cada grupo por 15 a 20 *Lutzomyias*. (6 grupos de Gamboa, 46 grupos de Altos de Campana y 51 grupos de Santa Clara n° 2). A cada grupo se le extrajo ADN con el método de fenol-cloroformo alcohol isoamílico para posteriormente ser sometida las muestras a la PCR. La prueba resultó positiva en 9 de los 103 grupos analizados (8.7%). Para Gamboa no hubo resultado positivo en los grupos, mientras que para Altos de Campana 4 de 46 grupos resultaron positivos (8.7%) y para Santa Clara n°2 5 de 51 (9.8%) grupos fueron positivos

El corte con enzimas de restricción (*Rsa I* y *Hae III*) permitió identificar las muestras positivas cuando fueron comparadas con cepas patrón, identificándose 8 de las 9 muestras positivas (89%) como *Leishmania panamensis* y una muestra identificada como *Leishmania sp*

Los resultados de esta tesis nos indican que la técnica de la PCR es un arma de gran valor diagnóstico al momento que se va a incriminar a *Lutzomyias* como vectoras de leishmaniasis así como para conocer las tasas de infección de los vectores por el parásito.

Capítulo I

Introducción

Introducción

La leishmaniasis puede ser definida como un grupo de entidades clínicas causada por diferentes especies y subespecies de protozoarios del género *Leishmania*. La transmisión hacia el hombre generalmente ocurre mediante la picada de un insecto hematófago que ha adquirido el parásito de un reservorio mamífero infectado (zoonosis) (7,62). Dependiendo de la especie de *Leishmania* involucrada, los cuadros clínicos pueden resultar desde la forma cutánea de la enfermedad, hasta las formas de Leishmaniasis Mucocutánea y Leishmaniasis Visceral (3,7).

De acuerdo a informes de la Organización Mundial de la Salud es una de las 6 principales enfermedades que afectan a los países tropicales. Debido al incremento de los casos en los últimos años, representa un problema de salud pública importante con un estimado de 350 millones de personas en riesgo de adquirir la enfermedad y con 20 millones de personas actualmente infectados según la O.M.S. La enfermedad está presente en la costa europea del Mediterráneo y países vecinos, en el norte de África, en el Medio Oriente y en la parte sur de Asia. En América ha sido reportada desde la parte sur de los Estados Unidos hasta la parte norte de Argentina con excepción de Chile y Uruguay. Así mismo se han reportado algunos casos en República Dominicana y en algunas islas del Caribe (79,86).

En Panamá, la enfermedad es básicamente una zoonosis de animales forestales, la cual está presente en áreas boscosas y montañosas de casi todo el país, siendo las regiones de salud de Panamá Oeste, Bocas del Toro y Colón las que reportan el mayor número de casos (16,23,58,69). La leishmaniasis en Panamá es transmitida por la picada de las

hembras de pequeños dípteros hematófagos del género *Lutzomyia* (Orden Díptera, Familia Psychodidae, Sub-familia Phlebotominae) De las 76 especies de Flebótomos descritos en Panamá, solo 7 de las especies antropofílicas han sido encontradas naturalmente infectadas con parásitos del género *Leishmania* (23,84)

La detección del agente etiológico en el vector y la posterior identificación de la especie es un trabajo arduo y que requiere de personal altamente capacitado y con mucha experiencia.

Tradicionalmente la incriminación de un insecto como especie vectora de leishmaniasis ha requerido de largos procedimientos que involucran la disección, la observación de sus intestinos en busca de formas flageladas y el cultivo de estos en medios especiales para protozoarios los que posteriormente serán identificados con métodos isoenzimáticos, con anticuerpos monoclonales o con el uso de sondas de ADN marcadas (2,17,23) Estos métodos antes mencionados son lentos, laboriosos, caros y no son convenientes para la aplicación sobre un gran número de muestras Otra alternativa al cultivo lo ha ofrecido el inocular promastigotes procedentes de un intestino infectado a un animal susceptible (23) Hoy día el desarrollo de nuevos métodos de Biología Molecular han ayudado a la detección e identificación de forma rápida de agentes etiológicos presentes en insectos vectores brindando un diagnóstico más certero que otras técnicas con una alta sensibilidad y una alta especificidad (8,26,38) En la actualidad, la Biología Molecular ha tenido grandes éxitos. En 1988, Rogers y colaboradores reportan el uso de la técnica de hibridización con sondas del ADN del cinetoplasto (kADN) para detectar flagelados del género *Leishmania* en vectores y diferenciarlos de flagelados no patógeno (*Endotrypanum*), pero para 1990 Rodgers reporta el uso de la amplificación del

kADN como un arma para la detección y diagnóstico de leishmaniasis (76,78). En 1992 Pascale y colaboradores describen el clonaje del ADN del cinetoplasto de *Leishmania* con la finalidad de ser usadas como sondas para el diagnóstico clínico de la enfermedad y para la detección del parásito en su vector (*Lutzomyia sp*) (71).

La biología molecular ha permitido la identificación de la secuencia de nucleótidos del ADN del cinetoplasto (kADN) de los parásitos del orden Kinetoplastida y del ADN del cinetoplasto de los parásitos de *Leishmania*. Actualmente se han desarrollado iniciadores (primers) específicos para género utilizadas en la identificación de *Leishmania sp* mediante la técnica de PCR (13). A partir de 1994 la reacción en cadena de la polimerasa ya era utilizada en países como Venezuela, Brasil y Perú para estudios de detección de *Leishmania* en insectos vectores (*Lutzomyia sp*) (72,79).

Actualmente en Panamá, la migración de la población a zonas boscosas con el fin de buscar mejores oportunidades de vida, ha traído como consecuencia la exposición de las mismas a diferentes enfermedades entre la que podemos mencionar la leishmaniasis (83,84) Entre los años 1988 y 1996, se ha observado un incremento en el número de casos de leishmaniasis de 582 a 2577 casos (47,53) Esta situación nos obliga a tomar medidas de control eficientes contra la enfermedad y una de las alternativas es el conocer las áreas en donde estos insectos estén transmitiendo la leishmaniasis Para tal fin es necesario la identificación del parásito en los vectores con una técnica que brinde resultados rápidos con una alta sensibilidad y especificidad En este sentido la utilización de la técnica de PCR representa un arma diagnóstica de gran valor para estudios epidemiológicos en diversas zonas de Panamá

El presente trabajo tiene como objetivos:

- 1 Validar la técnica de “Biología Molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)” en la detección de agentes etiológicos de leishmaniasis en sus vectores
- 2 Identificar el parásito detectado por la técnica de PCR, mediante la digestión del producto amplificado con endonucleasas de restricción
- 3 Determinar la tasa de infección de poblaciones de *Lutzomyia sp* procedentes de tres áreas de la República de Panamá, así como identificar los potenciales vectores e infecciones latentes en dichas áreas.

Capítulo II
Generalidades

I. Antecedentes

Leishmaniasis es el nombre que reciben las enfermedades causadas por protozoarios del género *Leishmania* (Phylum Sarcomastigophora, Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae) los que son transmitidos por la picada de las hembras de pequeños dípteros hematófagos del género *Lutzomyia* en América y *Phlebotomus* en el viejo mundo (Orden Diptera, Familia Psychodidae, Sub-familia Phlebotominae) (3,33,61)

Las leishmaniasis se encuentran presentes en 100 países de diversos contextos geográficos, con una prevalencia de 12 a 14 millones de casos y una incidencia anual de unos dos millones casos, de estos 500,000 son de Leishmaniasis Visceral y casi 1,500,000 de Leishmaniasis Cutánea (3,7) En el mundo, la población en riesgo de adquirir la enfermedad, está estimada en cerca de 350 millones de personas (79) La mayor parte de los casos viscerales se concentran en el subcontinente de la India y en el este de África, mientras que el 90% de los casos cutáneos aparecen en el suroeste de Asia y norte de África. La enfermedad está presente en la costa europea del Mediterráneo y países vecinos, en el norte de África, en el Medio de Oriente y en la parte sur de Asia En América ha sido reportada desde la parte sur de los Estados Unidos hasta la parte norte de Argentina con excepción de Chile y Uruguay Así mismo, se han reportado algunos casos de la República Dominicana y en Isla Martinica

La mayoría de las leishmaniasis son zoonosis que se presentan en áreas rurales o periurbanas por lo que el hombre se infecta sólo de manera esporádica con el parásito o cuando interviene en el ciclo selvático de la enfermedad (3,7,23) Los grupos de población con mayor riesgo de verse afectados por esta enfermedad son aquellos que incursionan en zonas endémicas con fines agropccuarios, programas de reforestación,

construcción de obras civiles (carreteras, represas) y actividades mineras. La mayoría de los casos ocurren en campesinos de escasos recursos y bajo nivel educativo que invaden tierras en busca de asentamiento para explotar la agricultura de subsistencia. Muchas de las comunidades que se forman, se encuentran alejadas de los establecimientos de salud por lo que presentan dificultades de acceso a una atención de salud oportuna y de calidad (16)

Según la especie de *Leishmania* que infecte a una persona, podemos estar frente a úlceras cutáneas de evolución benigna que en ocasiones se complican hacia formas mucocutáneas o de Leishmaniasis Cutáneas Difusas. En otros casos puede presentarse formas de leishmaniasis con afecciones viscerales, las cuales son fatales sin tratamiento.

La prevalencia tiende al aumento, pues se detectan casos en zonas hasta ahora libres de la enfermedad, además hay mayor cantidad de casos reales que enfermos declarados oficialmente (16,40,69,84). La leishmaniasis es considerada una de las enfermedades más antiguas que ha afectado a la humanidad a lo largo de los siglos. Escritos encontrados en el Asia Central, que datan de la primera centuria, describen una enfermedad cutánea, cuyos signos clínicos son similares con las de la leishmaniasis. Durante exploraciones arqueológicas realizadas en el Perú y en Ecuador, se obtuvieron piezas de cerámica elaboradas entre los años 400 y 900 D.C., que muestran rostro con desfiguraciones semejantes a las descritas por los historiadores españoles en los indígenas peruanos durante la conquista española, que pudieran relacionarse con alguna de las secuelas que deja la leishmaniasis luego de su padecimiento. La primera descripción clínica de la leishmaniasis en América data del siglo XVI durante la conquista española cuando Fernando de Oviedo (1535) y Pedro Pizarro (1571) describen la enfermedad (15,61)

II. Leishmaniasis en Panamá

En Panamá, el primer caso de leishmaniasis fue reportado en 1910 por el Dr S. T Darling, un año después de ser descrita la enfermedad por investigadores brasileños (23)

La leishmaniasis es un enfermedad de notificación obligatoria en nuestro país. Hasta el año de 1952 se habían notificado solamente 31 casos de esta enfermedad. A partir de 1981 se observó un incremento en las tasas de incidencia anuales de la enfermedad, incremento que se mantiene durante la década de los noventa, preocupando de manera especial el aumento progresivo de la incidencia en los menores de 5 años de edad (16,23).

Esta situación demuestra una tendencia hacia el aumento de los casos a nivel nacional, siendo actualmente la zoonosis parasitaria transmitida por vectores de mayor incidencia en Panamá. Su distribución geográfica afecta a todo el territorio nacional.

Para el año 2000 el mayor número de casos se registró en las regiones de salud de Panamá Oeste con 894 casos (36.8% del total), Bocas del Toro con 585 casos (24.1%) y Colón con 449 (18.5%) (57).

A la leishmaniasis se le conoce en nuestro medio rural con varios nombres populares, entre los que podemos mencionar “picada de bejuco”, “picada de ya te vi”, “picada bayano”, “picada de papalomoyo”(16,84).

La *Leishmania panamensis* es el principal agente etiológico de la Leishmaniasis Cutánea en la República de Panamá, pero no es la única especie involucrada en los casos de leishmaniasis en el país (23).

Petersen y colaboradores en 1987 (73) publicaron un caso de Leishmaniasis Cutánea causado por *Leishmania amazonensis*. Kreutzer y colaboradores aislaron *Leishmania colombiensis* de *Lutzomyia gomezi* en el área de Colón (16).

Solamente entre el 2 al 5 % de los casos de Leishmaniasis Cutánea reportados en Panamá, evolucionan

hacia la forma mucocutánea de la enfermedad Ningún caso de la forma difusa de la enfermedad ha sido reportado a pesar de la presencia de *L mexicana amazonensis* en Panamá (16,69)

III. Agente etiológico

El parásito causante de la leishmaniasis fue descrito en 1903 por Leishman, Donovan y Wright a partir de biopsias viscerales y cutáneas de enfermos de la India (3)

Los protozoarios del género *Leishmania* son parásitos digénicos realizan parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del insecto vector en forma flagelada (promastigote), y dentro de las células mononucleares del hospedero vertebrado en forma aflagelada o amastigote

El género *Leishmania* se encuentra ubicado dentro del Reino de los Protistas (3,61) de la siguiente manera

Reino	PROTISTA Haeckel, 1866
Subreino	PROTOZOA Goldfuss, 1817
Filo	SACOMASTIGOPHORA Honigberg-Balamuth, 1963
Subfilo	MASTIGOPHORA Deising, 1866
Clase	ZOOMASTIGOPHORA Calkins, 1909
Orden	KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963
Suborden	TRYPANOSOMATINA Kent, 1880
Familia	TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901
Género	<i>Leishmania</i> Ross, 1903

Cuando una *Lutzomyia* toma sangre de un vertebrado, inocula los promastigotes presentes en la parte anterior de su aparato digestivo. Una vez el parásito se localiza en los capilares cutáneos del hospedero vertebrado, se produce su fagocitosis por el macrófago quien lo engloba en una vacuola parasitófora para tratar de eliminarlo. La

Leishmania evade esas reacciones inmunológicas inespecíficas del vertebrado y comienza a multiplicarse en su interior. Las células parasitadas que circulan en el interior del hospedero vertebrado son ingeridas por otra *Lutzomyia*, en cuyo intestino se liberan los amastigotes que recuperan la forma de promastigotes y por varios días se multiplican, alcanzando su capacidad infectiva (metacicloogénesis) situándose finalmente en las proximidades de la probóscide quedando así dispuestos para ser inoculados, con lo que se cierra el ciclo (3,7,33,61,62)

En los últimos 20 años la taxonomía de los parásitos del género *Leishmania* ha pasado por una serie de cambios. Inicialmente se pensaba que solamente existía una sola especie de *Leishmania* la cual causaba todas las formas clínicas de la enfermedad, pero algunos investigadores encontraron que había diferencias en la velocidad de crecimiento de estos parásitos en los medios de cultivo. Al mismo tiempo observaron que existían grupos que se comportaban de manera diferente cuando eran inoculados en animales de laboratorio. De esta forma se estableció una primera clasificación la cual agrupaba a estos protozoarios en parásitos de crecimiento rápido y de crecimiento lento (40). Para 1979, Lanson y Shawn hicieron énfasis en el modo de desarrollo del parásito en el tracto digestivo del vector. Ellos agruparon todas las especies dentro de tres secciones: hipopilaria, peripilaria y suprapilarias. Las primeras son las más primitivas desde el punto de vista evolutivo y en la actualidad están representadas por el género *Sauroleishmania* sp, cuya transmisión se da por contaminación fecal (3). Este género es propio de reptiles y no es de importancia médica para el hombre. Las especies de la sección peripilaria se encuentran en una situación intermedia. En este grupo la transmisión se da en la porción anterior del vector y se agrupa en esta sección las especies del subgénero *Viannia*, todas

del Nuevo Mundo, las cuales parasitan mamíferos primitivos como son los armadillos, perezosos y osos hormigueros. Las leishmanias del subgénero *Leishmania* se multiplican en las porciones suprapilóricas próximas a la probóscide, son parásitas de mamíferos más actuales, incluido el hombre, lo que indica que son las más recientes en la escala evolutiva (3,33,61)

A. Organización genómica del parásito

Los protozoos pertenecientes al orden Kinetoplastida presentan un ADN genómico (ADNg) localizado en el núcleo celular el cual está encargado de todo lo concerniente a la replicación del parásito, y un ADN extracromosómico situado en una única mitocondria llamado ADN del cinetoplasto o kADN. Además, presentan ADN en forma de minisatélites y elementos circulares. El cinetoplasto es una estructura que poseen los protozoos pertenecientes al Orden Kinetoplastida el cual se encuentra localizado dentro de la membrana mitocondrial. El cinetoplasto está constituido por 10^7 pares de bases de ADN mitocondrial o kADN el cual es visible al microscopio de luz como una masa oscura en forma circular. Este ADN mitocondrial o ADN del cinetoplasto representa hasta el 20% de todo el ADN del parásito (3). Este a su vez está formado por un gran número de moléculas llamadas maxicírculos y minicírculos, los cuales en conjunto forman una estructura con forma de red. Por cada cinetoplasto existen unos 50 maxicírculos de 30 a 40 kilobases. Se les atribuye las mismas funciones que tiene el ADN mitocondrial de otros sistemas celulares como es contener los genes que codifican los ARN ribosomales y algunas proteínas de la mitocondria (3,61). Los minicírculos son las moléculas más pequeñas del kADN. Su tamaño está entre 600 y 800 pb de tamaño en los

membros del género *Leishmania* Estos micróscopos poseen una región variable en el 80% de su longitud y unos 120 pares de bases conservados (3,5,17,61).

B. Taxonomía del parásito

Las distintas especies y subespecies de *Leishmania* son indistinguibles morfológicamente, sin embargo, dependiendo de la especie involucrada en la infección se puede estar frente a patologías muy diferentes, por lo que la taxonomía de este género reviste especial importancia debido a que ayuda a establecer un mejor diagnóstico, tratamiento, pronóstico y control de la enfermedad (3,5) Parte del estudio de la epidemiología de la leishmaniasis es la de demostrar la presencia de promastigotes de *Leishmania* en los vectores de la enfermedad e identificar la especie infectante.

El método estándar para la identificación de *Leishmania* es por isoenzimas; sin embargo, para la aplicación del mismo es necesario el previo aislamiento del parásito, sumado a que es una técnica lenta, laboriosa, cara, y consecuentemente no es conveniente para la aplicación sobre un gran número de muestras (3,5)

Los anticuerpos monoclonales también son usados en la diferenciación de las especies de *Leishmania* pero presentan una relativa falta de especificidad (2,3,42) Sondas para ADN genómico y ADN del cinetoplasto han sido desarrolladas ofreciendo una identificación más rápida y económica, aunque las sondas sólo son aplicables a material proveniente de cultivos de parásitos La necesidad de un método rápido, económico y confiable para la identificación del parásito es requerido en nuestro medio para propósitos epidemiológicos y taxonómicos La identificación de la especie del parásito también proporciona

información útil en la clínica para evaluar y escoger el régimen quimioterapéutico específico (3,5,43) Las actuales pruebas diagnósticas para la leishmaniasis han sido desarrolladas basándose en la amplificación *in vitro* de varios sitios blancos en su ADN como por ejemplo el ADN de los minicírculos del cinetoplasto (2) y los genes del rRNA (42) Los minicírculos del kADN son un blanco ideal para las pruebas de amplificación de ADN debido a que están presentes en número cercano a las 10,000 copias por célula y poseen una región variable la cual ofrece una discriminación exacta entre las especies (66) En adición a esto las secuencias del ADN de los minicírculos del cinetoplasto es conocida para muchas de las especies de *Leishmania*.

IV. Reacción en Cadena de la Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método “*in vitro*” de amplificación del ADN el cual fue introducido en 1985 El método de la PCR es simple y es un arma extremadamente poderoso para el diagnóstico (30) La adopción de una ADN polimerasa termoestable (*Taq*) en 1988 simplificó grandemente el proceso de desarrollo de la prueba, permitiendo la automatización de la PCR. Desde entonces un gran número de aplicaciones han sido desarrolladas en áreas de diagnóstico e investigación La PCR ha sido considerada como una versión simple de los procesos de replicación del ADN que ocurren durante la división celular Básicamente esta prueba consiste en tres pasos desnaturalización térmica del ADN blanco, anidamiento de los iniciadores y extensión de los iniciadores anidados por medio de la enzima ADN polimerasa (17,30). Estos tres pasos constituyen un ciclo de la reacción y este ciclo se repite un número de veces Cada ciclo dobla aproximadamente el número de moléculas blanco

Las electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio es el método más comúnmente utilizado en el análisis de los productos de PCR. Un gel de agarosa al 1 5% es el adecuado para el análisis de productos con tamaños comprendidos entre 150 y 1000 pb (30)

La confiabilidad de la PCR depende de una serie de factores como lo son:

- 1 Tiempo de anidamiento y de extensión
- 2 Temperatura de anidamiento
- 3 Concentración de dNTP
- 4 Concentración de Cloruro de magnesio ($MgCl_2$)
5. Tipo de ADN polimerasa (17,30)

En el área de la entomología la PCR ha sido utilizada en varios campos como por ejemplo en la incriminación de insectos vectores de enfermedades (26,38,39,72), en el estudio de poblaciones de insectos (10,32), y en el área de la entomología forense (12,64)

V. Amplificación del ADN al azar (RAPD) y restricción de los productos de PCR (PCR-RFLP).

El ADN de un parásito proveniente de biopsias, sangre o incluso de uno de los vectores de leishmaniasis, pueden ser detectados aun estando en cantidades muy pequeñas (igual a un solo parásito) mediante la amplificación de un fragmento de su secuencia gracias al uso de iniciadores en la reacción de polimerización de una segunda cadena de ADN (3) Una de las variantes existentes de la PCR, lo constituye la llamada amplificación del ADN al azar (*random amplified polymorphic DNA*) o RAPD. En esta

reacción de PCR se utiliza iniciadores arbitrarios diseñados al azar de sólo unas 10 a 12 bases los cuales sometidos a bajas temperaturas de anidamiento, se facilita la unión de estos a la hebra de ADN blanco. Esta técnica permite la discriminación entre los distintos géneros que forman el orden Kinetoplastida y entre las especies de *Leishmania* (3,17). Es ampliamente utilizada en taxonomía por su rapidez y por no requerir el diseño de iniciadores a partir de secuencias conocidas (12,32). Tiene, sin embargo, ciertas limitaciones en su reproducibilidad dependiendo, por ejemplo, de las marcas de termocicladores, enzima termoestable usada y otros factores del sistema. El mapeo de restricción es comúnmente utilizado como una vía para verificar la identidad de los productos de PCR. Esta técnica tiene la ventaja de no necesitar la purificación de los productos amplificados previo a la restricción y que muchas enzimas de restricción funcionan de forma óptima en una mezcla de restricción (17,30).

VI. Vectores de leishmaniasis

A. Biología

Los vectores de la leishmaniasis son insectos pertenecientes al orden Díptera, familia Psychodidae, Subfamilia *Phlebotominae*. Al menos 70 de las 700 especies y subespecies conocidas son capaces de transmitir este protozooario (62). En el Nuevo Mundo, las especies pertenecientes al género *Lutzomyia* son las vectoras de la leishmaniasis, mientras que los insectos del género *Phlebotomus* son los vectores de *Leishmania* en el Viejo Mundo. El género *Sergentomyia* es vector solamente de *Sauroleishmania sp*, flagelados no patógenos para el humano propios de reptiles (3,33,62). Ha habido intentos de reproducir la infección en otros vectores, pero estos no han prosperado (3).

El rol que jugaban las *Lutzomyias* en la transmisión de la leishmaniasis (agrupadas antes en el género *Phlebotomus*) fue demostrado por Cerqueira (1920) y Beaurepaire-Aragao (1922). Al mismo tiempo el papel de los flebotomos del viejo mundo era demostrado por Sergent, Parrot y Donatien (1921) (15).

La clasificación taxonómica de los flebotominos propuesta por Lewis y colaboradores en 1977 (63) es hasta el momento la clasificación más aceptada. En esta clasificación el género *Lutzomyia* incluye casi todas las especies americanas de la subfamilia, y todas las vectoras de leishmaniasis presentes en el Nuevo Mundo. Además de las leishmaniasis, los flebotominos son vectores de la bartonellosis y varios arbovirus (1,81).

En Panamá las *Lutzomyia* son vectores de los siguientes virus.

- 1 Virus Chagres aislado por primera vez de un paciente febril en Panamá. Hasta 1983 se habían reportado cuatro casos humanos con infecciones producidas por este virus. Se le ha incriminado su transmisión a *Lutzomyia ylephuletor* y a *Lutzomyia trapidoi* (1)
- 2 Virus Punta Toro aislado por primera vez en el año de 1966 en los Estados Unidos de un paciente proveniente de Panamá. Durante el desarrollo del proyecto de la Hidroeléctrica de Bayano el virus fue aislado catorce veces entre 1973 y 1977. *Lutzomyia sanguinaria* es el probable vector de esta virosis (1)

Al género *Lutzomyia* (Franca, 1924) pertenecen diminutos dípteros hematófagos de comportamiento nocturno. Se distribuyen geográficamente solo en el Continente Americano en muy diversos ambientes y a altitudes que van desde el nivel del mar en las zonas de selvas tropicales, hasta 3,400 metros sobre el nivel del mar (msnm) en los Andes. Las "Chitras" al igual que otros flebotomíinos son de condición terrestre y arbórea pero no acuática. Suelen reposar en los huecos de los árboles, cuevas, termiteros, madrigueras de roedores y de otros animales, grietas y oquedades en rocas o en la corteza de ciertos árboles. En estas áreas estos insectos encuentran un ambiente con humedad favorable, que los protege durante el día de los fuertes vientos (61,84,88). Son activos en la noche, durante el crepúsculo y en días oscuros, siempre y cuando no haya viento. Su vuelo es lento, silencioso, interrumpido y de un alcance limitado que generalmente fluctúa entre 100-200 metros, no obstante bajo la influencia del viento, alcanzan una distancia mayor. Las hembras son ávidas picadoras y ciertas especies tienen una atracción

especial por animales de sangre caliente, en cambio, otras prefieren alimentarse de animales de sangre fría (3,15) A diferencia de las hembras, los machos subsisten únicamente de jugos de plantas Los adultos de algunas especies de *Lutzomyia* presentan un fototropismo positivo, por lo que son atraídos por la luz, lo que explica que en ocasiones se les encuentre en habitaciones humanas, gallineros, establos y otros recintos en áreas rurales (70) Es en estas condiciones en donde puede realizarse la transmisión dentro de las áreas habitadas por el hombre.

Los flebótomos son insectos holometábolos, con metamorfosis completa que incluye la fase de huevo, cuatro estadios larvarios, una de pupa y la forma de adultos Los huevos son ovalados, de unas 350 μm de largo por 100 μm de ancho, estos presentan en su superficie esculturaciones en forma de escamas las cuales son de interés taxonómico (3) La ovipostura se realiza en lugares oscuros como madrigueras, huecos de árboles, huecos en las rocas, etc., con una humedad relativa alta, temperaturas constantes y ricos en material orgánico que garantiza la fuente de alimento para las larvas luego de que eclosionen los huevos (33,62)

Los adultos de las *Lutzomyia* presentan un tamaño de 2-3 mm, castaño claro, patas largas y todo el cuerpo recubierto por cerdas La cabeza tiene dos ojos compuestos, antenas filiformes y probóscide desarrollada como aparato picador-chupador. El tórax es robusto y las alas son lanceoladas, cubiertas por escamas, microtriquias y abundantes cerdas El abdomen posee diez segmentos, los tres últimos modificados para constituir la genitalia En el macho hay una fuerte armadura genital capaz de sujetar a la hembra

durante la fecundación y depositar su semen en la espermateca de esta (33,62). Los últimos segmentos abdominales en la hembra constituyen dos lóbulos laterales y dos cercos. El apareamiento se produce en el mismo momento de emerger los adultos de la pupa, atrayéndose mutuamente por acción de feromonas sexuales y por las diferentes frecuencias en el batir de las alas. Los machos son fitófagos de forma exclusiva y sólo las hembras son hematófagas (3,33,62).

La saliva de las *Lutzomyia* poseen apirasa y desintegrinas las cuales son sustancias tensioactivas y antiplaquetarias. Estas provocan la extravasación de sangre en el punto de la picadura y su fácil succión hacia el canal alimenticio (3).

De las 76 especies de "Chitras" que se han encontrado en la República de Panamá, tan sólo 5 de ellas han sido reportadas como vectores, a saber, *Lutzomyia panamensis*, *Lu gomezi*, *Lu trapidoi*, *Lu ylephiletor* y *Lu sanguinaria*, siendo estas precisamente las más abundantes en el suelo panameño (84). *Lutzomyia longipalpis*, vector de Leishmaniasis Visceral, ha sido reportada en varios sitios de la República de Panamá, aunque esta forma de la enfermedad no ha sido reportada en el país ni el vector ha sido encontrada naturalmente infectada con *Leishmania chagasi* (6,69).

B. Metaciclogénesis

Cuando un flebótomo toma sangre de un hospedero vertebrado con macrófagos parasitados, se necesitan de unas 24 a 36 horas para que los amastigotes sean liberados y se transformen en promastigotes. Simultáneo a esto, en el insecto comienza a formarse la membrana peritrófica en la primera hora después de la ingesta, la cual está constituida por quitina y las enzimas necesarias para digerir la sangre ingurgitada (3,7). El

promastigote en el interior del insecto digiere la hemoglobina gracias a la acción proteolítica de una proteasa presente en su membrana celular llamada gp63 y sintetiza enzimas quitinolíticas necesarias para poder escapar de la membrana peritrófica del estómago. Una vez que el promastigote sale de la membrana peritrófica, inserta el flagelo entre las microvellosidades del intestino medio torácico y el cardias. De esta forma el flagelado se va movilizandohacia las porciones anteriores del tracto digestivo y al mismo tiempo se divide y alcanza su capacidad infectiva. Ya en la porción anterior del tracto digestivo los promastigotes están listos para ser inoculados cuando se produzca la siguiente ingesta de sangre (3,7)

C. Capacidad vectorial

Para que se de la transmisión de la leishmaniasis, interactúan una serie de factores los cuales se relacionan unos con otros garantizando de esta forma la existencia del parásito en el ciclo de la enfermedad (3). Entre estos factores podemos mencionar los siguientes

1. La transmisión de la enfermedad debe darse de forma obligatoria por la picada de las *Lutzomyia*
2. La relación de la especie de *Lutzomyia* presente en la zona con la del vertebrado del cual se va a alimentar debe ser muy estrecha y específica
3. Las *Lutzomyia* deben presentar una tendencia hacia la antropofilia, de esta forma se da cierto riesgo epidemiológico a la picada del insecto

La gran mayoría de las especies de flebótomos necesitan ingurgitar sangre para garantizar el desarrollo de sus huevos. El tiempo que se tarda entre la ingesta de sangre y la puesta de huevos es lo que se conoce como ciclo gonotrófico. Debido a que en general los adultos viven una media de cuatro semanas, realizan el ciclo gonotrófico tres o cuatro veces (3).

Con el fin de evaluar el riesgo de transmisión en una zona y establecer las medidas de control oportunas, es imprescindible definir la capacidad vectorial de las especies de flebótomos presentes, la cual determina el riesgo epidemiológico. La capacidad vectorial viene condicionada por:

- 1 La densidad de la población, lo que implica una alta frecuencia media de picadura y un mayor número de flebótomos en la zona.
- 2 El índice de infectación de las *Lutzomyia* de la zona. Los vectores que poseen una mayor expectativa de vida, son aquellos que presentan mayor probabilidades de infectarse.
- 3 Duración del ciclo gonotrófico. Una vez que las *Lutzomyia* se infectan con las *Leishmania*, son capaces de transmitir el parásito durante toda su vida.

Existen además una serie de factores ligados a la etología del insecto. El sitio que frecuentan para picar (intra- o extradomiciliario), los sitios utilizados para reposar posterior a la ingesta de sangre (endo- y exofilico), y el hábito de picadura (diurno o nocturno), pueden explicar la forma en que se presenta la transmisión de la enfermedad. Este tipo de información es de mucha importancia al momento que se está evaluando la medida de control de la enfermedad en una zona determinada. La zoofilia o antropofilia indica la tendencia del insecto a picar animales o humanos. El alcance del vuelo en los

flebótomos no es un factor de mayor importancia debido a que este es muy corto. Otro factor que es importante considerar al evaluar el riesgo epidemiológico de la enfermedad está dado por el fototropismo positivo de las *Lutzomyia*, motivo por el que acuden en la noche a picar dentro de las viviendas (33,62)

VII. Reservorio

Se define como reservorio de una enfermedad aquel animal que garantice la existencia del agente etiológico facilitando así su posterior transmisión (3)

Por regla general un reservorio no sufre la enfermedad y de hacerlo es de forma crónica, sin embargo, éste no es un requisito indispensable para que se de la transmisión ya que esta depende de otros muchos factores como ya hemos mencionado

El reservorio principal de la Leishmaniasis Cutánea en nuestro país es el perezoso de dos dedos (*Choleopus hoffmani*) (23,44), pero la infección también ha sido encontrada pero menos frecuentemente en el perezoso de tres dedos (*Bradypus infuscatus*), el mono nocturno (*Aotus trivisgatus*), el mono tití (*Saguinus geoffroyi*), la rata arrocera (*Oryzomys capito*), la rata arbórea (*Tylomys panamensis*), el puercoespín (*Coendou rothschildi*), la rata espinosa (*Proechimys semispinosus*), la rata acorazada (*Hoplomys gymmurus*), el coatí (*Nasua nasua*), el cusumbí (*Potos flavus*), y el olingo (*Bassaricyon gabbii*). El perro (*Canis familiaris*) actúa como hospedero doméstico del parásito, sobre todo en aquellas áreas donde se mantiene un ciclo activo de transmisión (1,23,44)

Capítulo III
Materiales y Métodos

I. Colonización de *Lutzomyia gomezi*.

La metodología en esta etapa del trabajo está basada en las investigaciones de Dávila (1986), para la colonización de *Lutzomyia gomezi*

La colonia fue establecida en el insectario del Programa Centroamericano de Maestría en Entomología ubicado en el campus de la Universidad de Panamá y los adultos que iniciaron la misma fueron colectados en la comunidad de Buenos Aires, corregimiento de Chilibre, situada a aproximadamente 40 km de la ciudad de Panamá y a una elevación cercana a los 200 metros sobre el nivel del mar con un bosque húmedo y una vegetación de crecimiento secundario pionero

Para garantizar la colecta de *Lutzomyia* antropofílicas, se realizaron colectas con cebo humano en el área utilizando para ello aspiradores manuales (foto n° 1) El material colectado fue llevado al laboratorio de entomología de la Universidad de Panamá en donde fue separado los especímenes de *Lutzomyia gomezi* de las otra especie antropofílica del área (*Lutzomyia panamensis*) Para ello fue utiliza un estereoscopio y un aspirador manual el cual poseía un tubo de vidrio transparente que permitía observar los especímenes Los envases de cría utilizados eran de plástico con forma cilíndrica y con una capacidad de 1 dm³ Su fondo sus paredes estaban recubiertos de yeso. El fondo de yeso tenía un espesor de aproximadamente 1.5 cm De esta forma se garantizaba un microambiente óptimo para la oviposición, eclosión y posterior desarrollo de las etapas larvales. En el centro de la tapa de los envases se realizó un corte circular de aproximadamente 11 cm de diámetro en el cual fue colocada una tela de nylon de organza que garantizara la ventilación de los insectos y la alimentación de los adultos con

una solución saturada de sacarosa (foto nº 2) Los azúcares son un requisito indispensable para mantener a los adultos vivos después de la emergencia de los mismos y antes de su alimentación con sangre. Adicional a esto se abrió un orificio de 0.5 cm de diámetro por donde se introducirían los adultos. Cada envase recibió 50 especímenes entre machos y hembras. La jaula utilizada para la alimentación de las hembras adultas era de un pie cúbico con una manga de tela en uno de sus lados lo que permitía la entrada de los envases de cría sin que se escaparan los adultos de la misma. Previo a la introducción de las chitras se colocó un animal amarrado sobre un pedazo de madera del cual se alimentarian los insectos. En nuestra experiencia el animal utilizado fue un cobayo (*Cavia porcellus*) del que por espacio de dos horas (19:00 a las 21:00 horas) se alimentarian los adultos. Posterior a la alimentación y a la mañana siguiente los adultos eran sacados de la jaula y puestos en los envases de cría con la ayuda de un aspirador de boca. Este trabajo se realizaba con mucho cuidado debido a que las *Lutzomyias* en este momento eran bastantes delicadas debido a la turgencia observada en sus abdómenes como resultado de la alimentación. Los adultos eran mantenidos con solución de sacarosa saturada colocada en rollos de algodón para uso odontológico. Este era cambiado cada tres días. La mayoría de los huevos eran ovipositados en el fondo del envase de cría. Los que eran depositados en las paredes eran transferidos al fondo con la ayuda de un pincel de cerdas de camello humedecido en agua destilada. Para realizar esta operación fue necesario el uso de un estereoscopio. El alimento utilizado para las formas inmaduras fue el utilizado por Dávila (27) el cual consistía en una mezcla de comida de perro, comida de rata, hojas secas y heces de conejo. Esta mezcla era pulverizada con la ayuda de un

mortero y posteriormente esterilizado para eliminar los hongos presentes en la misma. Una vez a la semana se colocaba pequeñas cantidades del alimento en los envases de cría.

Los envases con crecimiento de hongos fueron sometidos a un tratamiento con Nistatina (micostatin de uso pediátrico) en una concentración de 500 U/l, concentración que no afectaba el desarrollo larval de los insectos.



Foto n° 1. Colecta de *Lutzomyia gomezi* en el corregimiento de Chilibre utilizadas en el levantamiento de la colonia

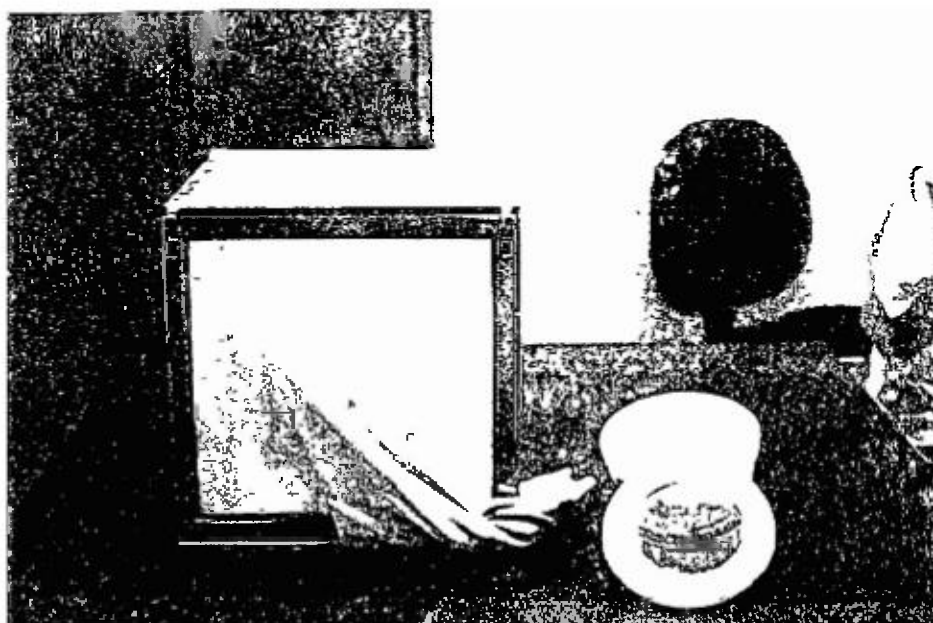


Foto n° 2. Envase de cría de *Lutzomyia gomezi* y jaula utilizada en la alimentación de los insectos adultos de la colonia

II. Sitios de colectas

Las áreas utilizadas en el presente trabajo se seleccionaron tomando en cuenta dos aspectos

- 1 La importancia de la leishmaniasis en zonas específicas (Santa Clara n° 2 y Altos de Campana)
- 2 La importancia ecoturística de las áreas (Gamboa y Altos de Campana)

Las colectas realizadas en las áreas de Gamboa y de Altos de Campana fue realizada por personal del Instituto Conmemorativo Gorgas como parte del proyecto de investigación titulado “Elaboración de una normativa de salud para el sector ecoturístico” el cual se realiza en dicho instituto Las colectas realizadas en la comunidad de Santa Clara n° 2 fue realizada por mi persona junto a la colaboración del Sr. Roberto Rojas, persona con más de 30 años en el trabajo de campo con *Lutzomyia* y otros insectos vectores de enfermedades

A. Caracterización del área de Gamboa

Para los fines de éste trabajo, el área de muestreo se ubicó de acuerdo a la posición geográfica del Camino Oleoducto específicamente el Río Frijoles, el cual está entre 90° 9' 50'' N y 79° 44' 55'' O (mapa n° 1) Gamboa se encuentra ubicado en la provincia de Panamá, distrito de Panamá, corregimiento de Ancón La comunidad está enteramente rodeada de áreas naturales de un gran valor ecológico, hidrológico e histórico, como lo son el Río Chagres y el Parque Nacional Soberanía Es importante

mencionar que Gamboa es uno de los puntos centrales de la Cuenca Hidrográfica del Canal de Panamá, por lo tanto es un lugar estratégico en funcionamiento de esta

En el área encontramos montañas bajas y cerros altos, con altitudes relativas entre 100 y 280 msnm, el relieve oscila entre mediana y fuertemente inclinado. La precipitación anual sobrepasa los 2500 mm de agua, con una estación seca generalmente en los primeros tres meses del año, en donde la precipitación no sobrepasa los 660 mm.

De acuerdo con el Sistema de Clasificación de Zonas de Vida del Mundo o Formaciones Vegetales de Holdridge, el área está clasificada como Bosque Húmedo Tropical (BHT). La vegetación observada en el área es principalmente de un Bosque Húmedo Tropical Semidecídulo, pero también se incluyen en la zona herbazales, ciénagas, márgenes de lago, riveras, bosques secundarios y algo de áreas de rastrojo (fotos n° 3-4)

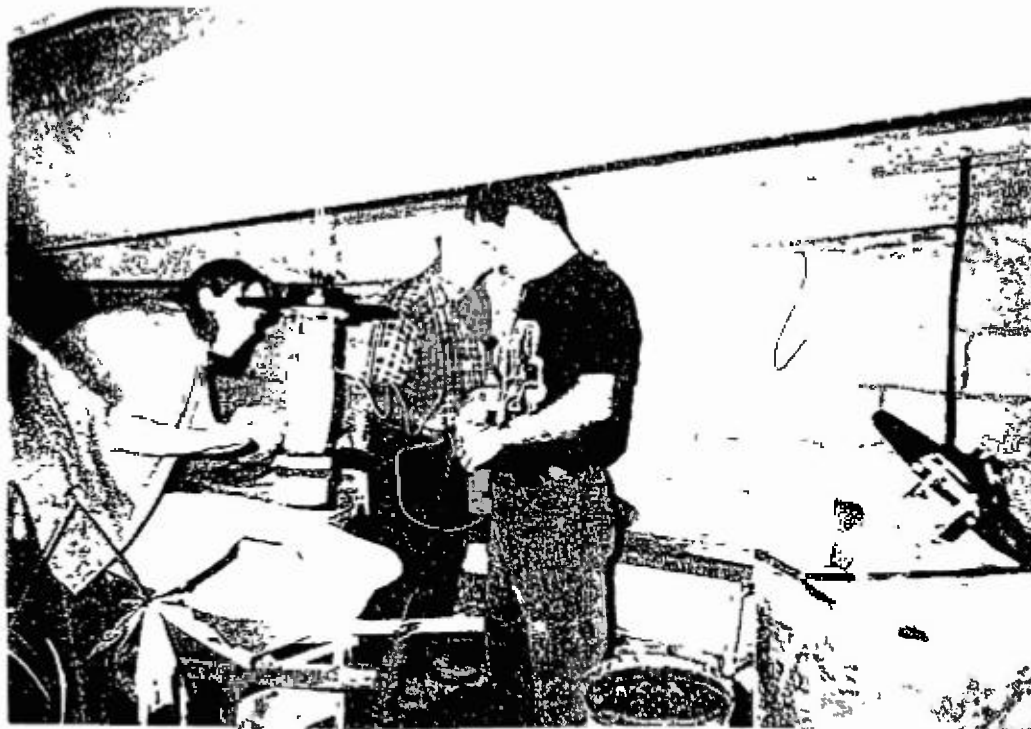


Foto n°3-4. Vista panorámica de los sitios de colecta utilizados por el personal del Instituto Conmemorativo Gorgas en las colectas de adultos de *Lutzomyia sp* en el área de Gamboa

B. Caracterización del área de Altos de Campana

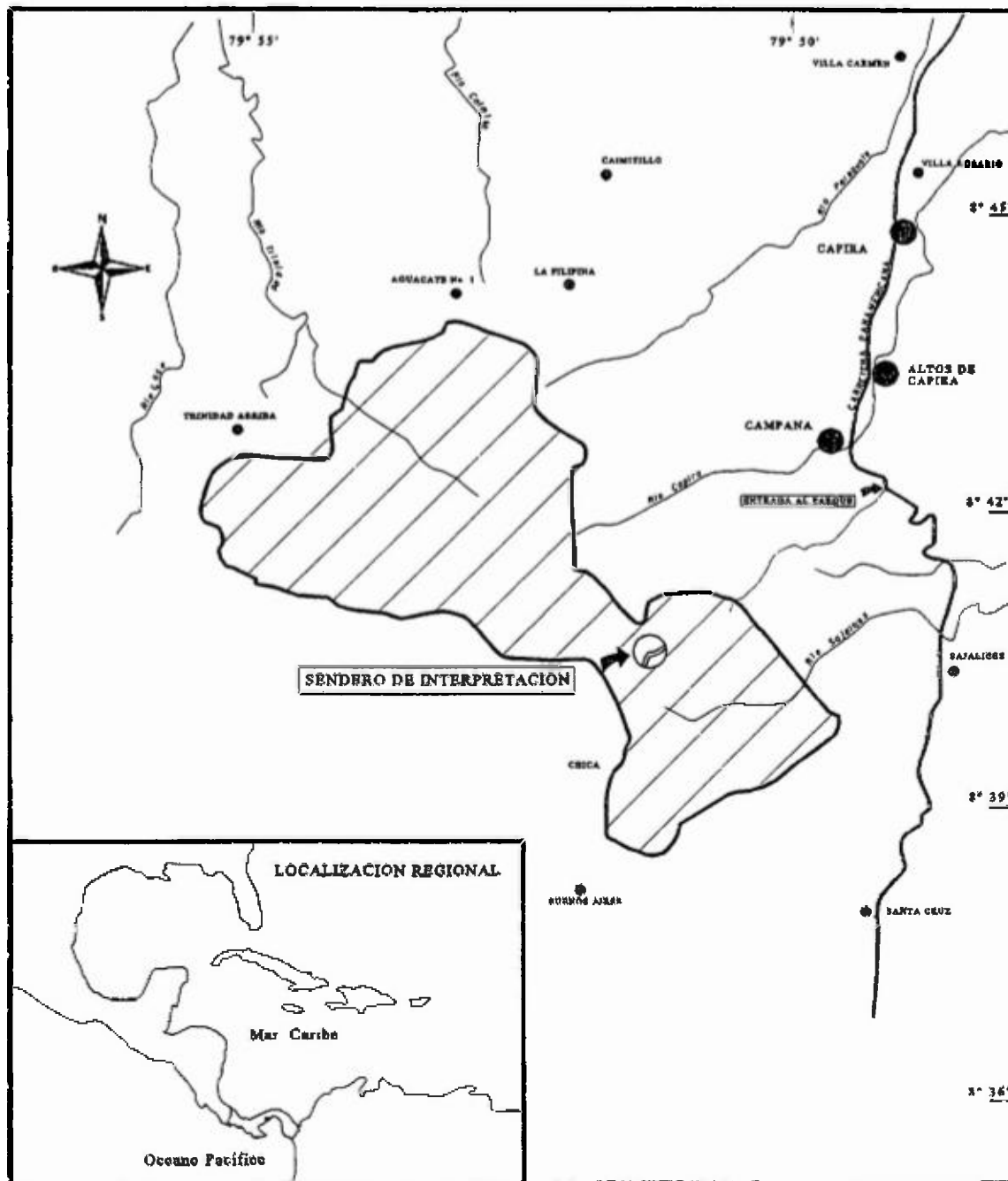
Campana se encuentra ubicada geográficamente entre los 8°39'44" Norte y los 79°49'57" Oeste (mapa n° 2) a 60 Km de la ciudad de Panamá. Políticamente se encuentra en la provincia de Panamá, entre los distritos de Capira y Chame, y los corregimientos del Cacao, Campana, Buenos Aires, Chica y Sorá. Presenta una superficie de aproximadamente 4816 hectáreas. En su paisaje regional sobresalen picos y cimas de montañas altas, con altitudes que sobrepasan los 600 msnm y más, se caracterizan por presentar pendientes abruptas, suelos delgados bien drenados, pedregosos y rocosos. En algunos lugares el suelo está fuertemente erosionado debido a sus numerosas pendientes y susceptibilidad a los deslizamientos. El promedio anual de precipitación pluvial sobrepasa los 2700 mm al año. La temperatura media del mes más fresco es inferior a los 18°C, pero la diferencia entre la temperatura media del mes más cálido y el mes más fresco es de menos de 5°C y está determinada por la altura del lugar, que en algunas zonas es mayor de 900 msnm.

En el Parque Nacional Campana se pueden encontrar 2 diferentes Zonas de Vidas según el sistema de clasificación de Holdridge. El Bosque Húmedo Premontano el cual podemos encontrarlo en zonas bajas de hasta aproximadamente los 600 msnm y el Bosque muy Húmedo Premontano el cual lo ubicamos en las zonas más elevadas del parque, encontrando algunos remanentes de bosque virgen y bosque secundario avanzado (foto n° 5-6).



Foto n° 5-6. Vista panorámica de los sitios de colecta utilizados por el personal del Instituto Conmemorativo Gorgas en las colectas de adultos de *Lutzomyia sp* en el área de Altos de Campana

PARQUE NACIONAL ALTOS DE CAMPANA



C. Caracterización del área de Santa Clara n° 2

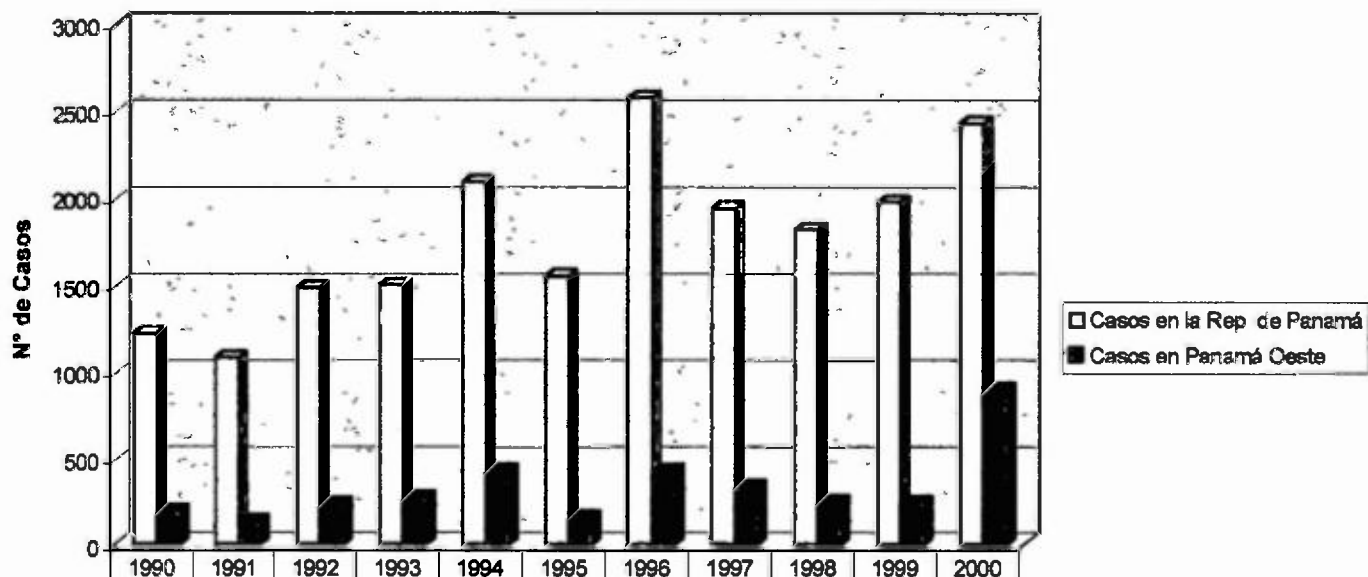
El poblado de Santa Clara n° 2 está ubicado en el corregimiento de Santa Clara, distrito de Arraján, provincia de Panamá. El área está indicada dentro del clima tropical húmedo, lo que significa que llueve alrededor de todo el año. La temperatura media anual se da a los 26.76 °C y una humedad relativa de 81%, según la estación meteorológica de Cristóbal. La precipitación promedio en el área es de 2,000 a 3,000 mm anuales. El área posee una altitud relativa de 120 a 150 msnm y presenta un relieve de pequeñas colinas, llanos, las pendientes van de ligeras a medianamente inclinadas. Este tipo de suelo no es arable, con limitaciones severas pero apto para pastos, bosques y tierras de reservas. El área específica de muestreo es de fincas familiares con vegetación secundaria pionera (rastrojos, arbustos, etc.) (foto n° 7-8)

De acuerdo a datos estadísticos suministrados por el Departamento de Epidemiología de la Región de Salud de Panamá Oeste, para el año 2000 en el distrito de Arraján se reportaron 56 casos de leishmaniasis, de los cuales 23 de estos casos procedían del Corregimiento de Santa Clara (57) (gráfica n° 1)



Foto n° 7-8. Vista panorámica del área de colecta en la comunidad de Santa Clara n° 2 (Arraján)

Casos de Leishmaniasis.
Rep. De Panamá, años: 1990 - 2000



	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
□ Casos en la Rep de Panamá	1217	1077	1485	1501	2093	1551	2577	1938	1820	1975	2427
■ Casos en Panamá Oeste	191	132	230	269	426	152	421	332	243	240	894

Gráfica n° 1

III. Métodos de colecta e identificación del material colectado

Para la recolección de las muestras de *Lutzomyia* en las áreas de interés, se utilizaron dos métodos de colecta

1. Colectas con trampa de luz tipo CDC (Communicable Disease Center).
2. Colectas utilizando cebo humano.

A. Colectas con trampas de luz tipo CDC.

La trampa CDC es una trampa muy utilizada debido a su pequeño tamaño y a la versatilidad de esta en el trabajo de campo. Fue diseñada originalmente para la captura de mosquitos transmisores de arbovirosis. Su uso se extendió posteriormente a la captura de otros insectos hematófagos

Está constituida por un tubo de plexiglás con dos hendiduras para la inserción de dos brazos que sostienen el pequeño motor del ventilador y que al mismo tiempo alimenta un pequeño bombillo colocado sobre la trampa, cuya luz es reflejada en un plato metálico que sirve de techo a la trampa. La luz de la trampa funciona como atrayente para las *Lutzomyia* debido al fototropismo positivo que estas presentan. En la otra extremidad del cilindro, se fija el mango de una jaula de tela de malla fina sostenida por dos aros paralelos. La energía para el funcionamiento del motor es provista por una batería de 6 voltios o 4 pilas de 1.5 v cada una (70)

Los flebótomos atraídos por la luz son aspirados dentro de la jaula pasando a través de las aspas del ventilador. La trampa se deja generalmente funcionando durante toda la noche o en el período en que las chitras presenten mayor actividad.

Numerosos estudios han demostrado que las trampas que, además de luz, utilizan CO₂ como atrayente, son más eficiente en la captura de flebótomos. El CO₂ actúa como un fuerte atrayente para los insectos hematófagos.

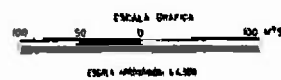
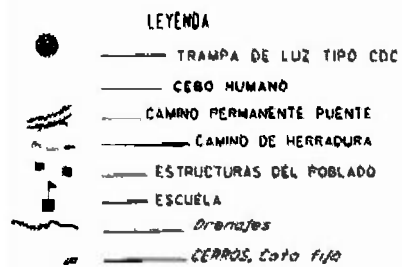
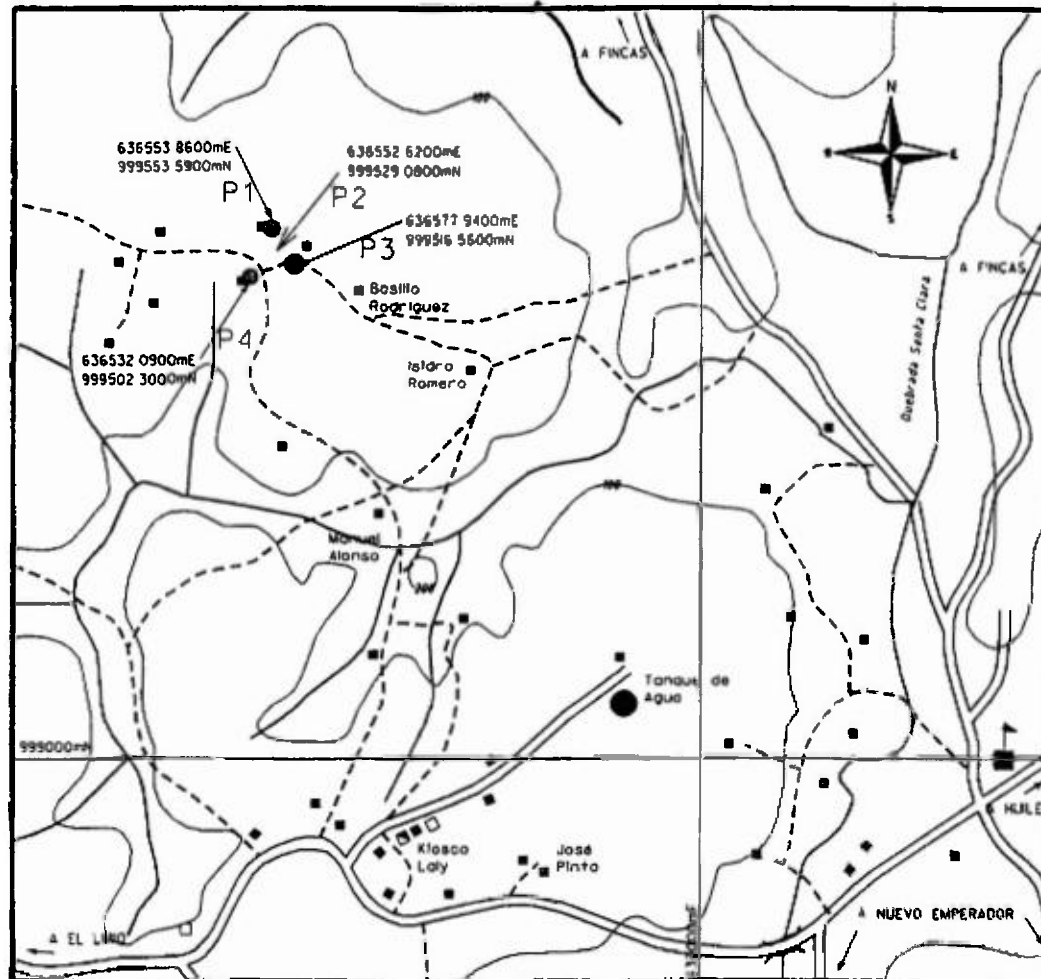
La combinación de los dos atrayentes, luz y CO₂ puede obtenerse colocando junto a la trampa CDC un bloque de CO₂ o hielo seco.

Estudios realizados por algunos investigadores demostraron mediante experiencias de campo que la utilización de hielo seco como fuente de CO₂ en trampas de luz incrementa la captura de flebótomos (70).

Las colectas en las áreas de Gamboa y Altos de Campana fueron realizadas por personal del Instituto Conmemorativo Gorgas como parte del proyecto "Elaboración de una normativa sanitaria para el sector ecoturístico". Las colectas en el área de Santa Clara n° 2 se realizaron en cuatro estaciones de muestreo 3 utilizando trampas tipo CDC y una utilizando cebo humano como atrayente (mapa n° 3). Los puntos de colecta fueron seleccionados en los alrededores de una vivienda en donde los miembros de la familia estaban afectados por leishmaniasis. Las trampas fueron colocadas a un metro y medio del suelo y junto a estas se colocaban dentro de sacos de tela los bloques de CO₂ de 1.5 libras (foto n° 9-10). Las trampas funcionaban entre las 18:00 y 23:00 horas de la noche. Para este estudio solo se realizaron colectas de formas adultas, con mayor énfasis en especies antropofílicas de comprobado potencial como vectores de leishmaniasis en Panamá y otros países de la región.

Mapa n° 3

PUNTOS DE CAPTURA DE *Lutzomyia sp.* EN SANTA CLARA DE ARRAIJAN



DEBIDO A SUAS CARACTERÍSTICAS, ESCALA NO PUEDE SER COMPAREDA CON EL INSTITUTO GEOGRÁFICO NACIONAL. TAMPOCO DEBE SER USADA PARA OTROS FINES QUE NO SEAN LOS ESTABLECIDOS EN EL MAPA DE REFERENCIA.

LOCALIZACION REGIONAL





Fotos n° 9-10. Trampas CDC con bloques de CO₂ (hielo seco) utilizadas en las colectas de *Lutzomyia sp* en comunidad de Santa Clara n° 2 (Arraján)

B. Colectas con cebo humano.

La colecta con cebo humano fue realizada por un técnico panameño con más de 20 años de experiencia en este tipo de colectas

IV. Identificación de especímenes

Las *Lutzomyias* colectadas con las trampas CDC fueron separadas de los demás insectos con la ayuda de un estereoscopio y junto con los especímenes de las colectas humanas se procedió a la identificación de este material utilizando para esto las claves de Chaniotis (18,19) y Young (88,89) Posterior a la identificación todo el material era puesto por especie en tubos cónicos de 1.5 ml de capacidad en grupos de entre 16 a 20 individuos para luego ser congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de iniciar el protocolo de extracción de ADN de las muestras de *Lutzomyias*

V. Laboratorio para el desarrollo de la PCR

Las pruebas en las que se maneja la amplificación de los ácidos nucleicos presentan la ventaja de ser técnicas altamente sensibles y específicas pero es necesario tomar precauciones para prevenir errores en nuestros resultados. La contaminación de las muestras o de los productos amplificados con ADN foráneo es una de las causas de error a la cual se le debe dar mucha importancia. Para evitar la contaminación durante la realización de la prueba de PCR, dividimos físicamente el Laboratorio en tres áreas: una área de pre-PCR, el área de la PCR y una última áreas a la que llamamos post-PCR.

- 1 Área de pre-PCR en esta área se extrajo el ADN de las muestras de *Lutzomyia* que previamente habían sido preparada en los laboratorios del Programa de Maestría en Entomología de la Universidad de Panamá
- 2 Área de PCR. esta contó con una campana de flujo laminar la cual era encendida y limpiada con etanol al 70% y agua destilada 15 minutos antes de preparar las reacciones de amplificación en ella. También esta área contaba con el Termociclador en el cual se darían las reacciones de la PCR
- 3 Área de post-PCR: en estas áreas se analizaron los productos amplificados mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio. Otra medida importante en los procedimiento para evitar la contaminación fue que las micropipetas utilizadas en cada área eran de uso exclusivo de estas.

Todas las puntas de las micropipetas y la cristalería utilizadas era autoclavada a 121 °C por 15 minutos previo a su uso. Las puntas una vez utilizadas eran desechadas. En todo momento se utilizó agua destilada y desionizada (con una resistencia de 18 MΩ). Las

superficies de las mesas de trabajo de todo el laboratorio eran limpiados cuidadosamente con etanol al 70% y agua destilada

VI. Extracción del ADN de los grupos de *Lutzomyia* fenol-cloroformo alcohol-isoamílico.

Los insectos presentan una barrera natural que protege sus tejidos y órganos de daños que le pueda producir diferentes agentes presente en su medio. Esta barrera de protección es el exoesqueleto constituido principalmente por quitina. Para poner en contacto los tejidos internos de las chitras con los reactivos utilizados en el proceso de extracción del ADN, fue necesario romper esta barrera natural. Para ello cada tubo de muestra fue tratado con 1 ml de nitrógeno líquido el cual congelaría a los insectos, facilitando de esta forma el daño mecánico de su exoesqueleto.

La maceración se realizó utilizando pestle (Sigma Co.) (foto n° 11). Después de dos minutos de maceración agregamos 500 µl del buffer de lisis (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA + 1% SDS) y cada tubo fue puesto en un baño húmedo a 65 °C por espacio de 30 minutos, agitando por inversión cada 10 minutos. Pasado los 30 minutos a cada muestra se le agregó 500 µl de fenol cloroformo alcohol-isoamílico. Estas se agitaron por espacio de 2 minutos de forma manual hasta obtener una emulsión completa. Las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 10,000 rpm y el sobrenadante formado posterior a la centrifugación fue colocado en un nuevo tubo cónico de 1.5 ml previamente identificado. A continuación para precipitar el DNA agregamos a cada tubo con muestra 0.5 ml de alcohol isopropílico más 50 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2 agitamos por inversión manual observando la aparición de pequeñas cantidades de ADN observables como hebras de color blanco suspendidas en la fase líquida. Cada tubo fue centrifugado por un minuto a 10,000 rpm para formar un botón sólido y compacto de ADN en el fondo del tubo. Eliminamos el sobrenadante y procedimos a lavar el ADN con 500 µl de etanol frío al 70%, resuspendiendo el botón y centrifugando nuevamente por un minuto a 10,000

rpm. Finalmente el sobrenadante se eliminaba y los tubos eran secados colocándolos en un baño seco a 65 °C. Una vez seco se añadió 20 µl de TE (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA) a las muestras.

Para evaluar el proceso de extracción de ADN de los grupos de *Lutzomyia sp.*, se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa para confirmar la presencia de ADN en las muestras procesadas. Posterior a esto todas las muestras fueron almacenadas en el laboratorio dentro de un congelador a -20 °C hasta el momento de su uso.



Foto n° 11. Sistema utilizado para la maceración de los grupos de *Lutzomyia sp.* consistente en un tubo cónico de 1.5 ml y un pequeño dispositivo para macerar (pestle).

VII. Optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para *Leishmania sp.*

La metodología de amplificación del ADN del cinetoplasto de *Leishmania* se inició con la optimización del sistema de amplificación. Para ello fue importante determinar la especificidad y la sensibilidad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), así como determinar si existe algún efecto inhibitorio de la ADN polimerasa por parte de alguna sustancia presente en los vectores de Leishmaniasis.

A. Especificidad de la prueba de PCR

Para evaluar la especificidad de la prueba de PCR para *Leishmania sp.*, los iniciadores (primers) fueron probados con el ADN del cinetoplasto de seis especies de la familia Trypanosomatidae: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Herpetomona sp.*, *Leptomona sp.* y *Crythidia sp.* sumado a estas especies se amplificó el ADN del cinetoplasto de seis especies de *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. aristidesi*, *L. hertigi*, *L. amazonensis* y *L. garnhami*). Las reacciones en esta parte del trabajo se prepararon por duplicado utilizando para ello dos juegos de iniciadores (primers): el primer par llamado KEN1 (GCG TTC AAA GAT TGG GC) y KEN2 (CGC CCG AAA GTT CAC C) el cual amplifica el ADN de especies miembros de la Familia Trypanosomatidae y el segundo par llamado Leish1 (CAA ACT GGG GGT TGG TGT AA) y Leish2 (TTT TGA ACG GGG TTT CTG) los cuales reconocen una secuencia presente en el cinetoplasto de las especies del género *Leishmania sp.*

B. Sensibilidad de la prueba de PCR

Para evaluar la sensibilidad de la prueba de PCR para *Leishmania* utilizamos 9.2 x

10^7 parásitos de una cepa de *Leishmania panamensis*. A esta cantidad se le extrajo ADN por el método de fenol-cloroformo alcohol isoamílico y el ADN resultante fue resuspendido en un volumen de 50 μ l de TAE. Del ADN extraído se tomaron 5 μ l y se colocaron en 45 μ l de agua para PCR, dando como resultado una dilución de la muestra de 1 / 10. Esta dilución equivale a 9.2×10^5 parásitos de *Leishmania* o bien a 9.2×10^{-9} gramos de ADN del cinetoplasto de acuerdo a trabajos de Harris y colaboradores (43). A partir de esta dilución se procedió a hacer las siguientes diluciones seriadas: 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000 y 1/1000000. Este procedimiento fue repetido utilizando una suspensión de ADN de *Lutzomyia gomezi* procedentes de la colonia para realizar las diluciones. De esta manera se estaría evaluando el efecto inhibitorio que algún componente del vector pudiera tener sobre la PCR para *Leishmania sp.*

C. Amplificación del ADN de *Leishmania sp.*

Para la amplificación del ADN de *Leishmania* se utilizó reactivos de la compañía Pharmacia (Ready – To – Go PCR). Este reactivo era para ser usado en termocicladores para tubos de 0.2 ml y el volumen final de la reacción fue de 25 μ l. Para la preparación de la reacción de PCR se utilizaron puntas con filtro, previamente autoclavadas. Las pipetas utilizadas fueron de uso exclusivo en la preparación de las reacciones de PCR y todas las reacciones fueron preparadas en el interior de una campana de flujo laminar la cual encendida 15 minutos antes de su uso y limpiada en su interior con alcohol al 70%. Las perlas contenidas en los tubos para PCR, (Ready – To – Go PCR) contenían de forma liofilizada el tampón para la reacción, dinucleótidos, cloruro de magnesio y la *Taq* polimerasa. A este solo era necesario agregar agua bidestilada (libre de *DNAsa* y *RNAsa*),

los iniciadores para *Leishmania* y el ADN blanco o de la muestra. Antes de iniciar la preparación de las reacciones el termociclador (2400 Perkin Elmer) era encendido verificando que su funcionamiento era el correcto. Cada grupo de amplificación consistía de 22 muestras, un control negativo y un control positivo. Los tubos de reacción eran rotulados antes de iniciar la preparación de la mezcla. Dentro de la cámara de flujo laminar se colocaban los reactivos, las muestras, controles, puntas con filtro y pipetas. Se procedió a preparar una mezcla madre para las 24 reacciones. Esta era preparada de la siguiente manera:

	Volumen por reacción	Volumen total
Agua bidestilada	20 μ l	480 μ l
Iniciador 1	1 μ l	24 μ l
Iniciador 2	1 μ l	24 μ l

El volumen final de la mezcla de reacción o mezcla madre fue de 528 μ l.

A cada tubo de reacción se le agregó 22 μ l de la mezcla madre e inmediatamente se añadió el ADN de las muestras y los ADN controles. Los tubos se mezclaron gentilmente, se taparon y fueron colocados en el plato del termociclador (foto n° 14-15).

El control negativo utilizado en las pruebas era ADN de *Lutzomyia gomezi* procedente de una colonia de laboratorio y por consiguiente libre de infecciones por protozoarios del género *Leishmania*. El control positivo contenía ADN de cepas patrones de *Leishmania panamensis* procedente de cultivos. Una vez colocados los tubos en el termociclador, se inició la amplificación del ADN con un período de denaturalización inicial a 94 °C por 3

minutos, seguido de 40 ciclos los cuales contaban con tres fases: desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, anidamiento a 56 °C por un minuto y extensión a 72 °C por un minuto. Concluido los 40 ciclos, finalizó la amplificación con una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los productos de la amplificación fueron detectados mediante su separación utilizando para ello una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE (Tris-Borato-EDTA).

VIII. Preparación del gel de agarosa al 1.5%

Las electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio es el método más comúnmente utilizado en el análisis de los productos de PCR. Un gel de agarosa al 1.5% es el adecuado para el análisis de productos con tamaños comprendidos entre 150 y 1000 pb (30).

Para la preparación del gel de agarosa se pesaron 1,5 gramos de agarosa (Sigma Co) esta fue depositada en un erlenmeyer limpio y seco de 200 ml de capacidad. En este se agregó TBE (Tris-Borato-EDTA) al 0.5% hasta alcanzar la marca de 100 ml del erlenmeyer. Se tapó con papel aluminio para evitar la evaporación del contenido al ser sometida a calor en un plato caliente. En este permaneció hasta que se disolviera toda la agarosa. Posteriormente se dejó enfriar hasta aproximadamente 40 °C y se le agregó 5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). La agarosa se vertió en el molde y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez el molde se había solidificado, fue colocado dentro de la cámara de electroforesis la cual contenía en su interior tampón TBE al 0.5%.

IX. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Para cargar las muestras y los controles en el gel de agarosa fue necesario mezclar 8 μ l de las mismas con 2 μ l de tampón de carga 5X (Loading buffer, Sigma Co). El gel fue sometido a una corriente eléctrica de 100 V por 45 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó un producto de 100 pb (1 μ l/ml en TE a pH de 7.5) (foto n° 12).

X. Visualización de los productos amplificados

Culminada la electroforesis el gel fue sacado de la cámara y colocado directamente sobre un transiluminador de luz ultravioleta (UV) para poder visualizar los fragmentos del ADN amplificado (foto n° 13), para que finalmente pudieran ser fotografiado con una cámara Polaroid con películas 667.

XI. Confirmación de los productos amplificados

Todas las muestras positivas fueron nuevamente amplificadas siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente con la variante de que en vez de usar iniciadores específicos para el género *Leishmania* sp se utilizaron iniciadores para la Familia Kinetoplastidae.

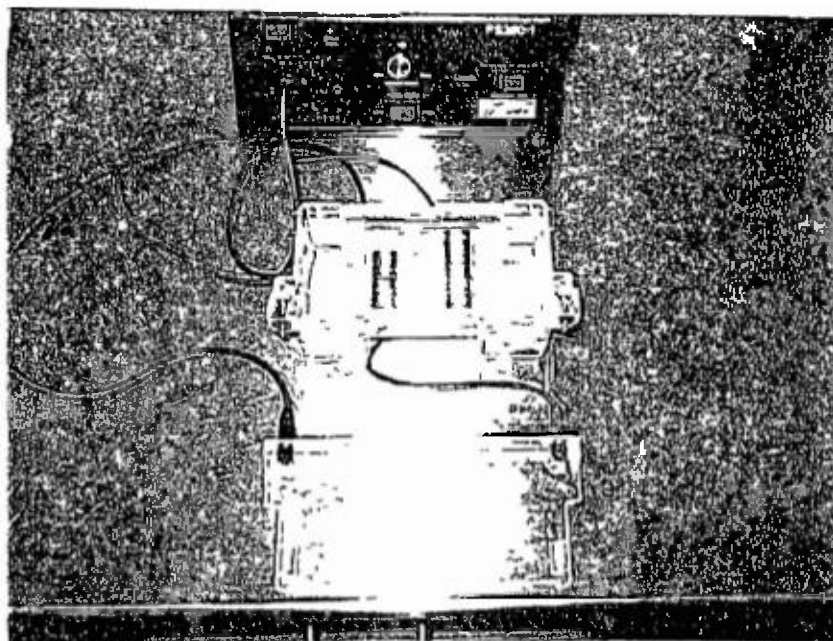


Foto n° 12. Fuente de poder y cámara para electroforesis utilizada en la separación de los productos amplificados

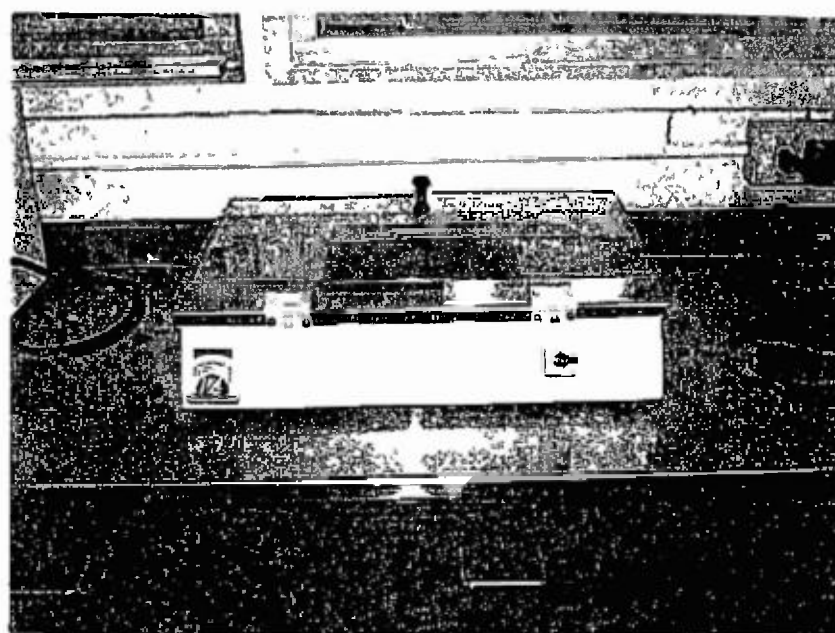


Foto n° 13. Transiluminador de luz ultravioleta utilizado en la visualización de los fragmentos de ADN

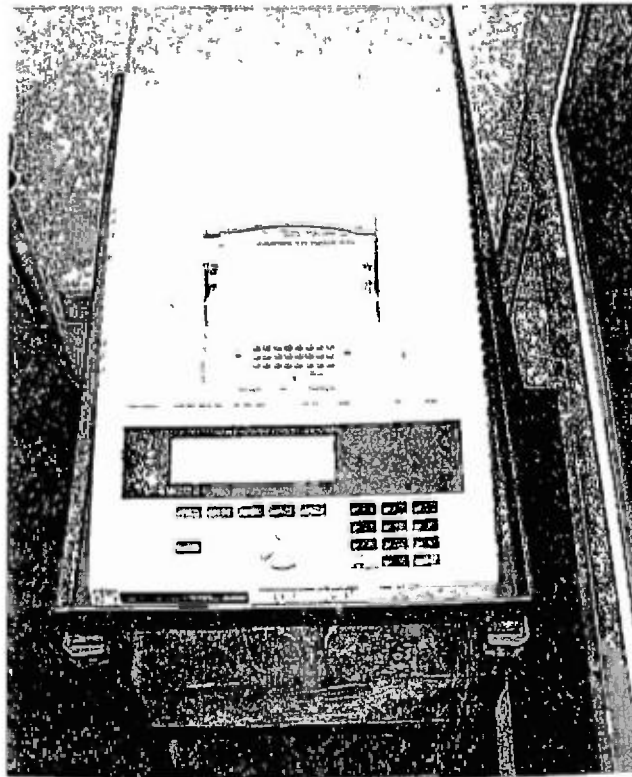


Foto n° 14. Termociclador utilizado en la amplificación del ADN de las muestras de *Lutzomyia sp*

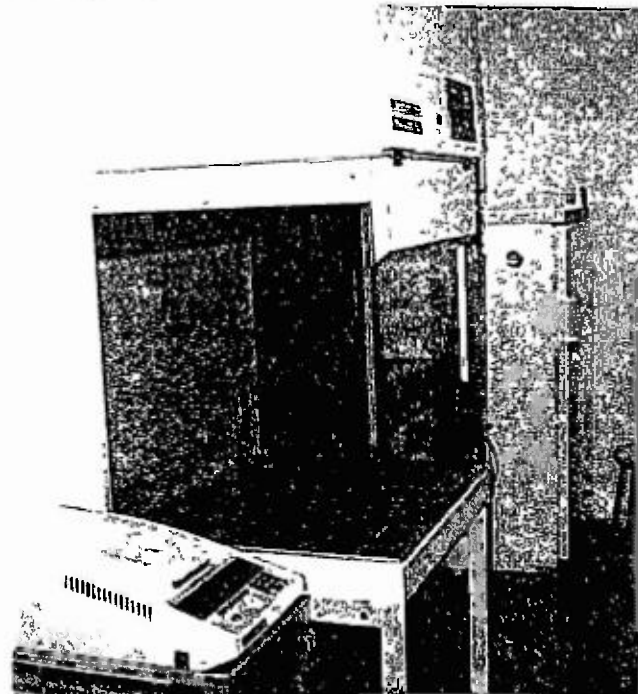


Foto n° 15. Área utilizada para la amplificación del ADN de *Leishmania sp* en donde se observa la campana de flujo laminar y el termociclador empleado en este procedimiento

XII. PCR-RFLP o Restricción de los productos de PCR

El mapeo de restricción es comúnmente utilizado como una vía para verificar la identidad de los productos de PCR. Esta técnica tiene la ventaja de no necesitar la purificación de los productos amplificados previo a la restricción y que muchas enzimas de restricción funcionan de forma óptima en una mezcla de restricción

Antes de la digestión del ADN amplificado de las muestras se procedió a la amplificación

de 6 cepas de *Leishmania* las que serían comparados con las muestras

Las cepas correspondían a

- *Leishmania mexicana mexicana*
- *Leishmania mexicana aristidesi*
- *Leishmania mexicana garnhami*
- *Leishmania mexicana amazonensis*
- *Leishmania guyanensis panamensis*
- *Leishmania mexicana hertigi*

En un tubo cónico estéril de 1.5 ml se preparó un mezcla madre para la digestión de los productos amplificados de las muestras más el ADN amplificado de las cepas patrones antes citadas. En el mismo se agregó 60 µl de agua, 30 µl de buffer H (Boehringer Co) para digestión y 15 µl de cada enzima (*Hae III* y *Rsa I*). Esto hizo un volumen final de 120 µl. En 15 tubos de 0.5 ml previamente autoclavados y rotulados se colocó 8 µl de la mezcla madre para digestión. Posteriormente se agregó 15 µl del ADN amplificado de

cada muestra y 15 μ l del ADN amplificado de cada cepa patrón. Esta mezcla fue incubada en un baño húmedo a 37 °C durante toda la noche. Los productos obtenidos de la digestión fueron visualizados por el método antes descrito de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE.

Capítulo IV

Resultados

I. Colonización de *Lutzomyia gomezi*.

La colonia de *Lutzomyia gomezi* se mantuvo por 4 generaciones en el insectario del Programa Centroamericano de Maestría en Entomología. Los insectos hembras fueron la fuente de ADN de vectores de Leishmaniasis libre de flagelados de la familia Trypanosomatidae (*Leishmania sp* y *Endotrypanum sp.*).

II. Identificación morfológica de las *Lutzomyias*.

A. Áreas de Gamboa y Altos de Campana

Las *Lutzomyias* colectadas e identificadas por personal del Instituto Conmemorativo Gorgas fueron separadas en grupos tomando en cuenta su área de colecta y la especie de *Lutzomyia* colectada. Solo fueron procesadas por la técnica de PCR aquellas especies antropofílicas y que han sido reportadas como vectoras de leishmaniasis.

Para el área de Gamboa un total de 99 *Lutzomyia* hembras de fueron colectadas *Lu panamensis* (n = 34), *Lu sanguinaria* (n = 20), *Lu gomezi* (n = 20), *Lu Trapidoi* (n = 19) y *Lu olmeca bicolor* (n = 6) Cuadro n° 1

Para el área de Altos de Campana un total de 859 *Lutzomyia* hembras fueron colectadas:
Lu ylephilator (n = 570), *Lu panamensis* (n = 188), *Lu sanguinaria* (n = 47), *Lu trapidoi* (n = 42), *Lu gomezi* (n = 12) Cuadro n° 2

Cuadro n° 1

<i>Lutzomyia</i> sp. colectadas en Gamboa		
Especie	N° de Individuo	N° de grupos
<i>Lutzomyia panamensis</i>	34	2
<i>Lutzomyia sanguinaria</i>	20	1
<i>Lutzomyia gomezi</i>	20	1
<i>Lutzomyia trapidoi</i>	19	1
<i>Lutzomyia olmeca bicolor</i>	6	1
Total	99	6

Cuadro n° 2

<i>Lutzomyia</i> sp. colectadas en Altos de Campana		
Especie	N° de Individuo	N° de grupos
<i>Lutzomyia ylephulator</i>	570	29
<i>Lutzomyia panamensis</i>	188	11
<i>Lutzomyia sanguinaria</i>	47	3
<i>Lutzomyia trapidoi</i>	42	2
<i>Lutzomyia gomezi</i>	12	1
Total	859	46

B. Área de Santa Clara n° 2

Las colectas e identificaciones en la comunidad de Santa Clara n° 2 fueron realizadas por nosotros como parte del presente trabajo. De un total de 1051 hembras de *Lutzomyia* colectadas en 4 diferentes estaciones de colecta, un total de 9 especies fueron identificadas: *Lu gomezi* (n = 635), *Lu panamensis* (n = 254), *Lu trapidoi* (n = 38), *Lu sanguinaria* (n = 36), *Lu pessoana* (n = 17), *Lu triramula* (n = 26), *Lu camposi* (n = 19), *Lu runoides* (n = 23) y *Lu olmeca* (n = 3). En tres de las estaciones de colectas se utilizaron trampas de luz tipo CDC, mientras que en una cuarta estación se encontraba una de las personas con más experiencia en este menester en Panamá. Los resultados de las colectas por ambos métodos se muestran en el cuadro n° 3. Solamente fueron consideradas las especies de interés en la transmisión de la leishmaniasis para ser sometidas a la prueba de PCR (Cuadro n° 4). Esporádicamente se colectaron otros géneros de la familia Psychodidae y algunos otros dípteros entre los cuales podemos mencionar Culicidae (*Anopheles sp*, *Culex sp* y *Psorophora sp*), Ceratopogonidae

Cuadro n° 3

Especies coletadas en el área de Santa Clara n° 2 contra método de colecta			
Especies	Método de Colecta		
	Trampa de Luz tipo CDC	Cebo Humano	Total
<i>Lu pessoana</i>	17	0	17
<i>Lu sanguinaria</i>	11	25	36
<i>Lu panamensis</i>	39	205	246
<i>Lu trapidoi</i>	21	35	56
<i>Lu gomezi</i>	130	495	625
<i>Lu olmeca bicolor</i>	3	0	3
<i>Lu camposi</i>	19	0	19
<i>Lu triramula</i>	26	0	26
<i>Lu runoides</i>	23	0	23
Total	269	827	1051

Cuadro n° 4

<i>Lutzomyia</i> sp. colectadas en Santa Clara n° 2		
Especie	N° de Individuo	N° de pool o grupos
<i>Lutzomyia gomezi</i>	635	32
<i>Lutzomyia panamensis</i>	254	13
<i>Lutzomyia trapidoi</i>	38	3
<i>Lutzomyia sanguinaria</i>	36	2
<i>Lutzomyia pessoana</i>	17	1
Total	980	51

III. Extracción del ADN de *Lutzomyia sp.* colectadas en el campo.

El método de extracción fue evaluado sometiendo el ADN extraído a una electroforesis en gel de agarosa para visualizar la presencia del ADN de las muestras. Para tal propósito se tomaron de manera aleatoria 30 muestras, las cuales fueron sometidas a la electroforesis observando en todas las muestras analizadas la presencia de bandas de ADN. De esta forma pudo evaluarse la metodología de extracción en este trabajo (foto n° 16)

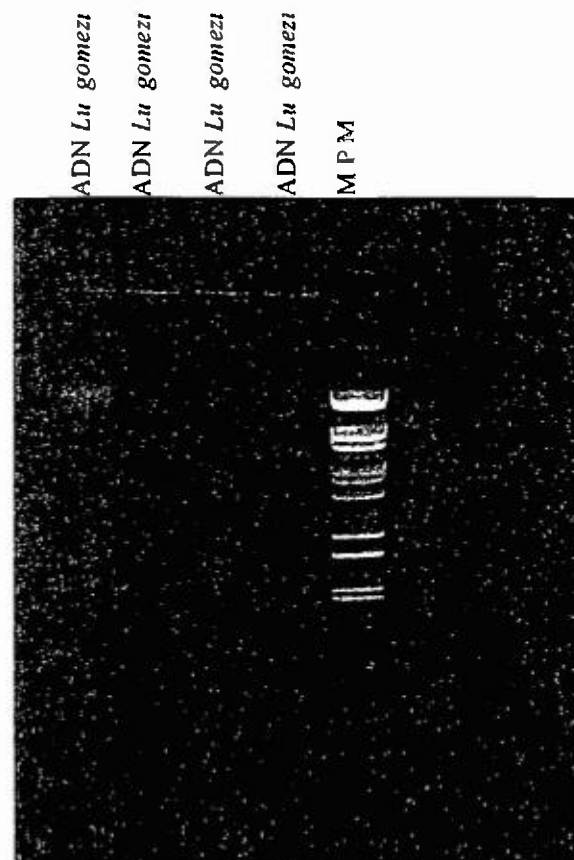


Foto n° 16. Evaluación del método de extracción de ADN a *Lutzomyia sp.* mediante electroforesis en gel de agarosa

IV. Sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR para *Leishmania*

Para evaluar la sensibilidad de la prueba de PCR para *Leishmania* utilizamos 9.2×10^7 parásitos de una cepa de *Leishmania panamensis*. A esta cantidad se le extrajo ADN por el método de fenol-cloroformo alcohol isoamílico y se resuspendió el ADN en un volumen de 50 μ l de TAE. El estimado de las cantidades de kADN que resultaban de las diluciones se detallan en el cuadro n° 5. La mayor dilución ensayada fue de 1 en 1,000,000 utilizando como diluyente agua primero y ADN de *Lutzomyia gomezi* en segundo lugar.

Cuadro n° 5

Sensibilidad de la PCR para <i>Leishmania sp.</i> utilizando <i>L. panamensis</i>		
Diluciones	Cantidad de Parásito	Cantidad de kADN (en gramos)
1 / 10	9.2×10^5	9.2×10^{-9}
1 / 100	9.2×10^4	9.2×10^{-10}
1 / 1000	9.2×10^3	9.2×10^{-11}
1 / 10000	9.2×10^2	9.2×10^{-12}
1 / 100000	9.2×10^1	9.2×10^{-13}
1 / 1000000	9.2	9.2×10^{-14}

Las amplificaciones en ambos modelos resultaron positiva por *Leishmania sp.* hasta la máxima dilución ensayada utilizando en ellas solamente los iniciadores (primers) Leish1 y Leish2, obteniéndose un producto de amplificación de aproximadamente 800 pb (foto n° 19).

La especificidad de la prueba de PCR para *Leishmania* fue probada sometiendo el ADN del cinetoplasto de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Herpetomona sp*, *Leptomona sp* y *Crythidia sp* junto con el de seis especies de *Leishmania* (*L mexicana*, *L panamensis*, *L aristidesi*, *L hertigi*, *L amazonensis* y *L garnhami*) a los dos juegos de iniciadores (primers) descritos en la metodología. Todos los productos de la amplificación con los iniciadores para género de *Leishmania* fueron de aproximadamente de 800 pb Los productos obtenidos con los iniciadores para familia fueron de aproximadamente 800 pb (fotos n° 17-18)

Los resultados de las reacciones se aprecian en el cuadro n° 6:

Cuadro n° 6

Especificidad de la prueba de PCR para <i>Leishmania</i> con los iniciadores Leish1 y Leish2		
Muestras	Iniciadores	
	KEN1 / KEN2	Leish1 / Leish2
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Positivo	Negativo
<i>Trypanosoma rangeli</i>	Positivo	Negativo
<i>Herpetomona sp</i>	Positivo	Negativo
<i>Leptomona sp.</i>	Positivo	Negativo
<i>Crythidia sp</i>	Positivo	Negativo
<i>Leishmania mexicana</i>	Positivo	Positivo
<i>Leishmania panamensis</i>	Positivo	Positivo
<i>Leishmania aristidesi</i>	Positivo	Positivo
<i>Leishmania hertigi</i>	Positivo	Positivo
<i>Leishmania amazonensis</i>	Positivo	Positivo
<i>Leishmania garnhami</i>	Positivo	Positivo

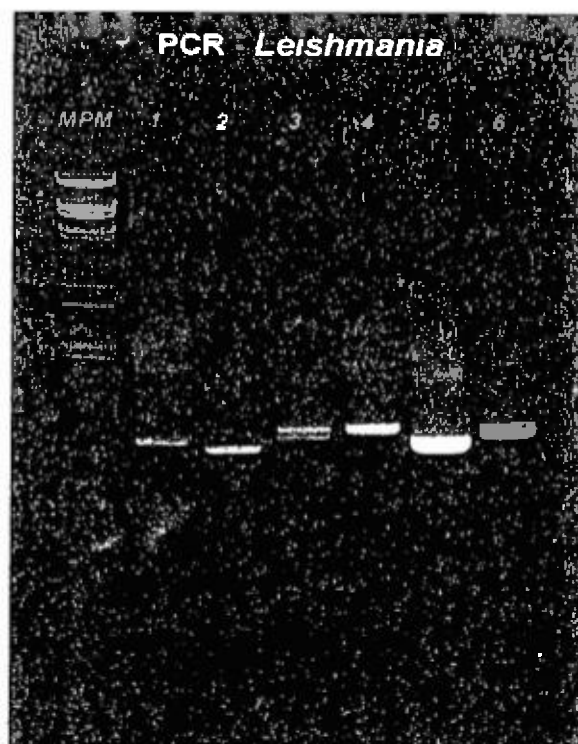


Foto n° 17. Electroforesis en gel de agarosa para PCR-*Leishmania* Especificidad de la reacción de PCR con los iniciadores *Leish1* y *Leish2* (MPM, marcador de peso molecular, 1, *L mexicana*, 2, *L aristidesi*, 3, *L panamensis*, 4, *L garnhami*, 5, *L amazonensis*)

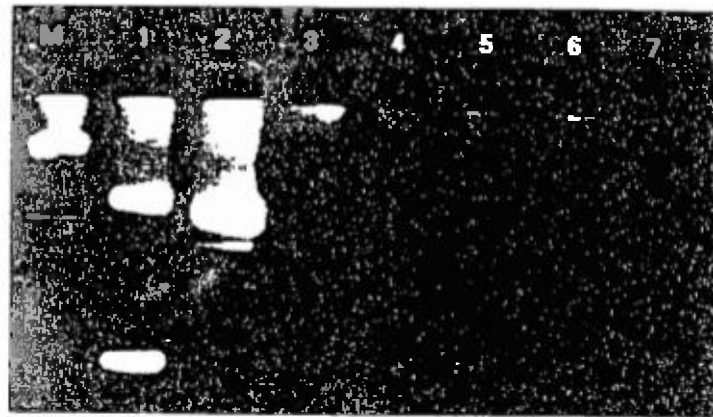


Foto n° 18. Electroforesis en gel de agarosa para PCR-*Leishmania* Especificidad de la reacción de PCR con los iniciadores Leish1 y Leish2 (MPM; marcador de peso molecular, 1, *L. mexicana*, 2, *L. panamensis*, 3, *Cnithidia* sp, 4, *Leptomona* sp, 5, *Herpetomona* sp, 6, *T. cruzi*, 7; *T. rangeli*

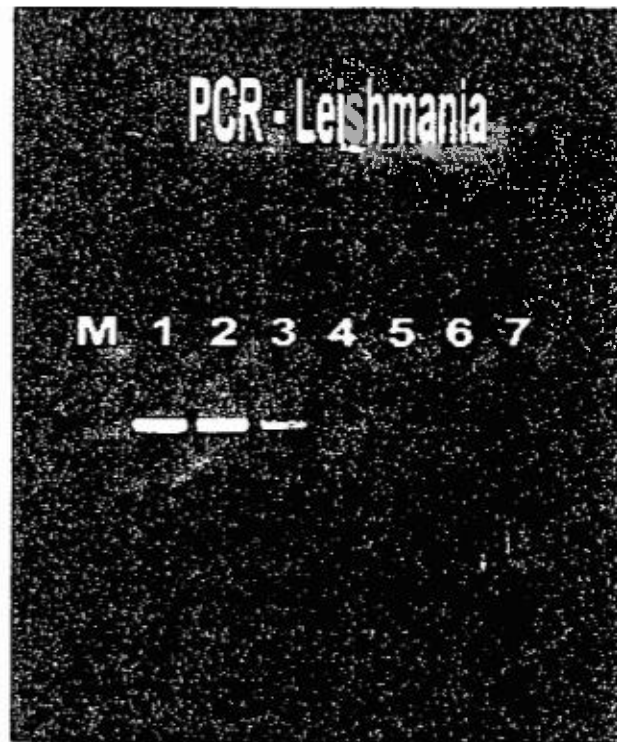


Foto nº 19. Electroforesis en gel de agarosa para PCR-*Leishmania*. Sensibilidad de la reacción de PCR con los iniciadores **Leish1** y **Leish2** utilizando diluciones del ADN de *Leishmania panamensis*

V. Evaluación del método de PCR para la detección de *Leishmania sp.* en *Lutzomyia sp.* colectadas en el campo.

El método de PCR para *Leishmania* fue validado sobre *Lutzomyias* colectadas en tres áreas de la República de Panamá un área de interés ecoturístico (Gamboa), un área de interés epidemiológico (Santa Clara n° 2, Arraiján) y una última área de interés tanto ecoturístico como epidemiológica (Altos de Campana) El ADN de *Leishmania* fue amplificado en 9 de los 103 grupos (8.9%) de *Lutzomyias* hembras analizadas (foto n° 20-21)

En el corregimiento de Santa Clara n°2, distrito de Arraiján, 5 de 56 (8.9%) pooles de *Lutzomyias* hembras resultaron positivos por la PCR. Cuatro (4) de los grupos pertenecían a *Lutzomyia gomezi* y uno (1) a *Lutzomyia panamensis*

Para el área de Altos de Campana, 4 de 42 (9.5%) de los grupos de *Lutzomyias* hembras resultaron positiva por la PCR. Todas las muestras positivas pertenecían a grupos de *Lutzomyia panamensis*

Para el área de Gamboa se analizaron un total de 6 grupos de hembras, las que hicieron un total de 99 *Lutzomyias*. Todas las muestras de esta área resultaron negativas por la PCR

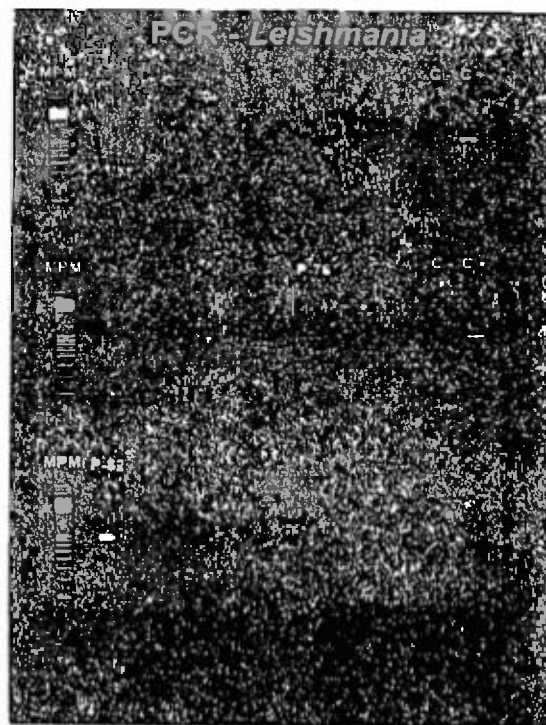


Foto n° 20. Electroforesis en gel de agarosa para PCR-*Leishmania* (MPM, marcador de peso molecular), (C-, control negativo), (C+, control positivo), (P-76 y P-82, grupo de *Lutzomyia* 76 v 82).

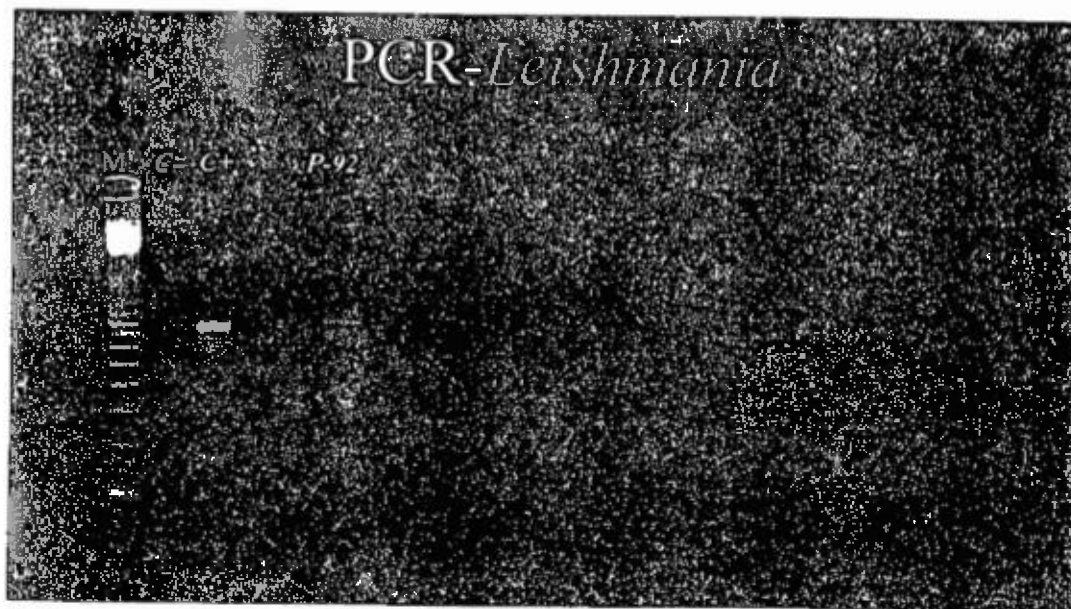


Foto n° 21. Electroforesis en gel de agarosa para PCR-*Leishmania* (M, marcador de peso molecular), (C-, control negativo), (C+, control positivo), (P-92, grupo de *Lutzomyia* 92)

VI. Identificación de los productos amplificados por la PCR de *Leishmania*

Las especies de *Leishmania sp* utilizadas en la prueba de especificidad fueron digeridas con las enzimas de restricción *Rsa I* y *Hae III* para determinar si los patrones resultantes por la digestión eran diferentes entre especies. Estas fueron analizadas mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (foto n° 22) y mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida (foto n° 23)

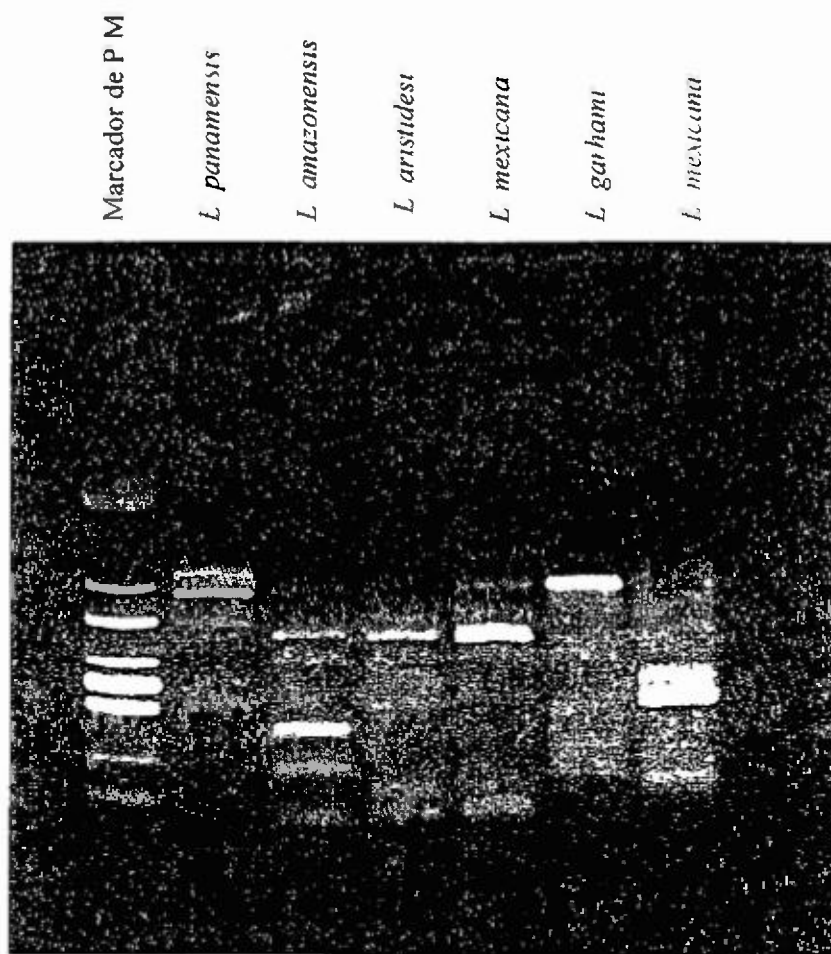


Foto n° 22. Análisis de los fragmentos amplificados por la PCR para *Leishmania sp* con electroforesis en gel de agarosa

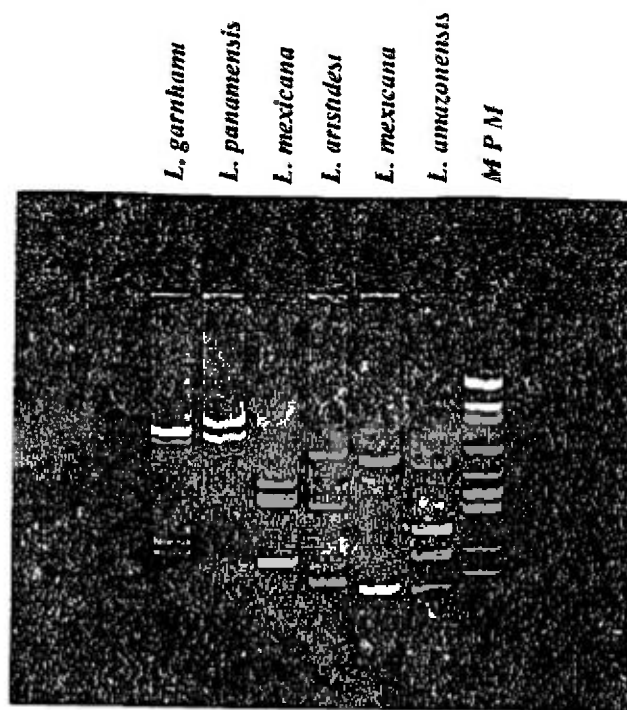


Foto n° 23. Análisis de los fragmentos amplificados por la PCR de *Leishmania sp* con electroforesis en gel de poliacrilamida.

La digestión de los fragmentos obtenidos de los productos de la PCR con las enzimas de restricción indicaron que 8 de las 9 muestras (88.9%) que resultaron positivas por la amplificación de ADN de *Leishmania sp*, presentaban un patrón de restricción idéntico al patrón de restricción de nuestra cepa patrón de *Leishmania panamensis* (foto n° 24, Cuadro n° 7)

El patrón de restricción observado en la muestra n° 17 el cual procedía de Altos de Campana presentó un patrón distinto al de las otras muestras (foto n° 25) En él se observaron 5 fragmentos de restricción muy similares a los observados en la cepa de

Leishmania garnhami Esta muestra fue catalogada como *Leishmania sp* y al igual que las otras muestras positivas procedentes de Altos de Campana este producto fue amplificado de un pool de *Lutzomyia panamensis*

Cuadro n ° 7

Resultados de la PCR-RFLP			
Muestra	Localidad	Especie vectora	Especie de <i>Leishmania sp.</i>
1	Santa Clara n 2	<i>Lutzomyia gomezi</i>	<i>Leishmania panamensis</i>
3	Santa Clara n 2	<i>Lutzomyia gomezi</i>	<i>Leishmania panamensis</i>
14	Altos de Campana	<i>Lutzomyia panamensis</i>	<i>Leishmania panamensis</i>
17	Altos de Campana	<i>Lutzomyia panamensis</i>	<i>Leishmania sp</i>
23	Altos de Campana	<i>Lutzomyia panamensis</i>	<i>Leishmania panamensis</i>
25	Altos de Campana	<i>Lutzomyia panamensis</i>	<i>Leishmania panamensis</i>
76	Santa Clara n 2	<i>Lutzomyia panamensis</i>	<i>Leishmania panamensis</i>
82	Santa Clara n 2	<i>Lutzomyia gomezi</i>	<i>Leishmania panamensis</i>
92	Santa Clara n 2	<i>Lutzomyia gomezi</i>	<i>Leishmania panamensis</i>

Foto n° 24

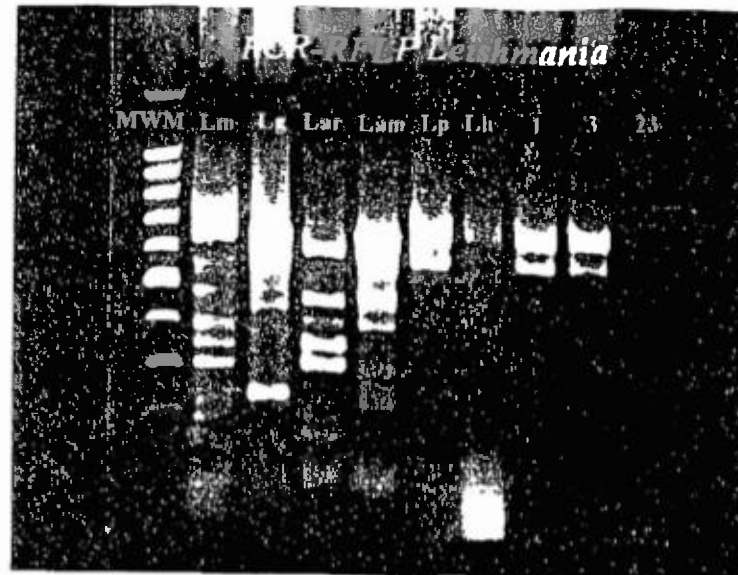


Foto n° 25

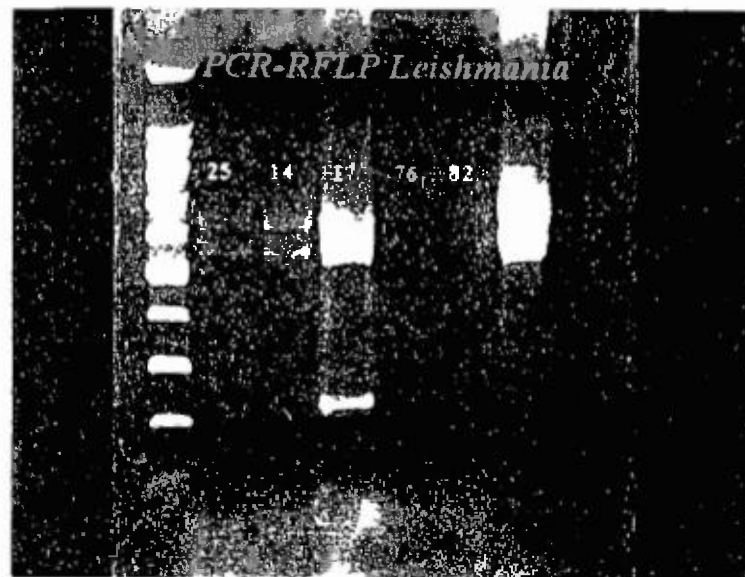


Foto n° 24 y 25. Identificación de *Leishmania sp* por PCR-RFLP en muestras de *Lutzomyia sp* colectadas en el campo MWM, marcador de peso molecular, Lm; *L mexicana*, Lg, *L garnhami*, Lar, *L aristidesi*, Lam, *amazonensis*, Lp, *L panamensis*, Lh, *L hertigi*, muestra 1 (*L panamensis*), muestra 3 (*L panamensis*), muestra 23 (*L panamensis*), muestra 25 (*L panamensis*), muestra 14 (*L panamensis*), muestra 17 (*Leishmania sp*), muestra 76 (*L panamensis*), muestra 82 (*L panamensis*), muestra 92 (*L panamensis*)

Capítulo II

Discusión

Un control eficiente de la leishmaniasis en las áreas en donde la enfermedad es endémica, requiere de un conocimiento completo de su ecología y epidemiología

Uno de los mayores obstáculos que encuentran los epidemiólogos e investigadores de esta enfermedad es la identificación de sus reservorios y especies vectoras. Por lo tanto, al encontrar flebótomos naturalmente infectados con el protozoario e identificar tanto la especie del vector como la del parásito sumado a otros datos de interés epidemiológico como lo es la tasa de infección del insecto, es posible estimar el riesgo de la población de adquirir la enfermedad en un área endémica

El uso del kADN para la detección e identificación de parásitos de *Leishmania* dentro de sus vectores ha sido usado por Ready (75), Rodríguez (77) y Rogers (78). Anteriormente en Panamá no existía un método molecular para incriminar vectores de leishmaniasis que presente una alta sensibilidad, especificidad y que sea poco laborioso, sin embargo nos hemos visto en la necesidad de adoptar algunos métodos de diagnósticos para los estudios epidemiológicos como lo son la disección de vectores, el aislamiento y la identificación del parásito

La alta sensibilidad de la prueba de PCR para el diagnóstico de *Leishmania* en los vectores *Lutzomyia* sp ha sido utilizada tanto en especies del Nuevo Mundo como en especies del Viejo Mundo (29) Reportes como los de Noyes (66) describen la utilidad de la PCR en la incriminación de vectores

Nosotros utilizamos la técnica de PCR para detectar el ADN de los minicírculos del cinetoplasto de los protozoarios del género *Leishmania* en *Lutzomyia* colectadas en el campo Durante la optimización de la técnica pudimos probar la especificidad de los iniciadores utilizados para el género *Leishmania* sp Pese a la presencia del ADN del

cinetoplasto de otros géneros de la familia Trypanosomatidae, estos iniciadores reconocieron solo la secuencia del ADN de este género y no para las especies relacionadas. Este resultado nos permite confiar en las amplificaciones de las muestras colectadas en el campo. Este aspecto de nuestro sistema es de gran importancia debido a que existen reportes que incriminan a especies de *Lutzomyia* de nuestro país como hospederos de flagelado como *Endotrypanum sp* y *Trypanosoma sp*.

Harris y colaboradores (43) reportaron la existencia de 15 especies de *Leishmania sp* en América por lo que en nuestro país es necesario contar con un método de detección de *Leishmania sp* en vectores capaz de detectar tanto las especies reportadas en el país como las especies pertenecientes a la zona que no hayan sido reportadas en Panamá.

Los resultados obtenidos al determinar la sensibilidad pudimos observar que en base a las diluciones del ADN de *Leishmania panamensis* hechas con agua para PCR y las hechas con el ADN de *Lutzomyia gomezi* procedente de la colonia, no hubo un efecto inhibitorio del ADN del insecto o de alguna sustancia presente en él. Al extraer ADN con el método de fenol-cloroformo alcohol-isoamílico se logra eliminar todas las sustancias que pueden jugar un rol de inhibidores de la actividad de la enzima *Taq* polimerasa, resultado comparable al obtenido por Aransay y colaboradores (5).

Durante la optimización de la técnica no se observaron resultados falsos positivos por contaminación cruzada y esto fue debido a que se siguió de forma estricta lo recomendado por Dennis Lo (30) en cuanto al control de calidad y al control de la contaminación en el área de trabajo.

La alta sensibilidad y especificidad de la prueba de PCR son necesarias, debido a que el sistema es capaz de detectar los parásitos en muestras de vectores traídas directamente del campo sin que se encuentre un inhibidor de la reacción de amplificación en ellas, sumado a la poca accesibilidad al cinetoplasto del parásito

Las muestra colectadas por personal del Instituto Conmemorativo Gorgas como parte del proyecto “Elaboración de una Normativa Sanitaria para el Sector Eco turístico” procedieron de dos áreas de la República de Panamá. Los resultados del área de Gamboa no pueden ser tomados como una muestra representativa de la zona ya que Escobar (1989) describió la gran abundancia de vectores de leishmaniasis en esa área. En dicha zona no se pudo contar con un número elevado de *Lutzomyia sp.* si comparamos el número de chitras colectadas con las otras dos áreas de Panamá (Gamboa = 99, Altos de Campana = 859, Santa Clara nº 2 = 980) los seis grupos analizados para Gamboa no arrojaron resultados positivos. En contraste con lo que observamos para el área de Altos de Campana podemos decir que pese a que la especie *Lutzomyia ylephiletor* es la más abundante en la zona (66% de las especies colectadas), resultó *Lutzomyia panamensis* (19.4% de las especies colectadas) la única especie infectada por parásitos del género *Leishmania sp*. Este resultado puede ser explicado si tomamos en cuenta que el reservorio que mantiene el ciclo selvático de la infección es mayormente preferido por las especies de *Lutzomyia panamensis* que por las especies de *Lutzomyia ylephiletor*

La Región de Salud de Panamá Oeste reportó para el año 2000 el mayor número de casos de leishmaniasis en el país (894 casos), lo que hace de esta región como

prioritaria en el establecimiento de medidas de control. Los resultados obtenidos de las colectas en Santa Clara n° 2 indicaron que la especie más persistente durante todas las noches de muestro fue *Lutzomyia gomezi*, obteniéndose ejemplares en todas las colectas con trampa de luz tipo CDC y utilizando cebo humano

Las colectas en esta área tuvieron como objetivo la captura de *Lutzomyia sp* y su posterior investigación como vectores positivos de leishmaniasis. En esta zona la especie más abundante durante el muestro resulto la única especie infectada por parásitos de *Leishmania panamensis*, de acuerdo a los resultados obtenidos en la PCR-RFLP. Es importante señalar que a pesar de encontrar un porcentaje de 9.8% de grupos de trabajos positivos, la leishmaniasis no es el único problema que enfrenta la comunidad en relación con insectos vectores. En las dos viviendas próximas a los sitios de colecta se encontró *Rodnius pallescens*, vector más importante en Panamá de la enfermedad de Chagas, mientras que en las horas del día *Simulium sp* pican de forma ávida a los miembros de las casas, afectando de manera significativa a los niños del área debido al gran número de picadas que se observa en ellos.

Los productos de la amplificación de la PCR fueron usados para la identificación de las especies de *Leishmania* que estaban infectando a los vectores. La habilidad para amplificar un mínimo de 8 especies de *Leishmania* es importante, haciendo de esta una técnica útil en las áreas de baja endemicidad donde estas especies están presentes. Otro aspecto importante de mencionar es que la técnica propuesta toma lugar en un simple tubo y por esto no es necesaria la manipulación extra en los primeros pasos de la amplificación. Las muestras de *Lutzomyia* que estaban alimentadas con sangre no le fue

aplicado ningún tratamiento adicional, consecuentemente hemos comentado que el sistema de extracción de ADN utilizado eliminó cualquier inhibidor que pueda afectar la actividad de la enzima Taq polimerasa y por ende la amplificación de la secuencia blanco. Este mismo ADN extraído de los insectos vectores puede ser usado en la identificación de la especie de *Lutzomyia* que estaba infectada si utilizamos la técnica de PCR-RFLP como lo describe Aransay y colaboradores(5).

Con respecto a la tasa de infección de las *Lutzomyia*, Christensen y colaboradores realizaron 10,012 disecciones de hembras de *Lutzomyia* pertenecientes a 33 especies. Sólo 812 *Lutzomyia* de 11 especies resultaron positivas por la presencia de flagelados. El porcentaje de *Leishmania* positivas resultó en un 0.06% del total de disecciones (6 aislamientos positivos) (23). La tasa de infección observada en nuestro estudio fue de 8.73%. Esta alta tasa de infección observada puede ser atribuida a la alta sensibilidad del ensayo. Sumado a esto está el hecho de que las muestras fueron colectadas en la misma zona y que las *Lutzomyia* infectadas resultaron de la misma especie para Altos de Campana (*Lutzomyia panamensis*) y de dos especies para Santa Clara no 2 (*Lutzomyia gomezi*, la más abundante del área y *Lutzomyia panamensis*). En adición a esto muchas de las muestras infectadas fueron colectadas en una misma zona, lo que podría indicarnos que en un momento dado la infección de los insectos podrían tener un mismo origen. La detección del ADN de *Leishmania* en una especie de *Lutzomyia* no necesariamente nos indica que esta sea vector de leishmaniasis debido a que esta prueba no distingue entre la presencia de amastigotes (que podrían estar presentes en un alimento con sangre

con células mononucleares infectadas) de promastigotes infectando en intestino de las chitras

De esta forma la técnica descrita es usada para investigar la presencia de *Leishmania* en poblaciones de vectores y reservorios, pero no debe ser utilizada como una única arma para la identificación e incriminación de una especie de *Lutzomyia* como vectora de leishmaniasis. La infección experimental de *Lutzomyia* puede ser utilizada como una prueba de transmisión para demostrar que una especie sospechosa es vectora de la enfermedad y lo más importante, que participa en el ciclo de transmisión de la misma.

La técnica de PCR utilizada para la identificación de insectos vectores de leishmaniasis, ha facilitado el diagnóstico entomológico y por ende evita la laboriosa disección de las chitras. A esto le sumamos el hecho de que un gran número de muestras pueden ser analizadas al mismo tiempo, facilita los resultados epidemiológicos en zonas de interés.

Es importante citar que el sistema evaluado en esta experiencia permitirá no solo reconocer las especies autóctonas de *Leishmania sp* si no que también es capaz de reconocer el ADN de especies que hasta el momento no han sido reportadas en nuestro país. De esta forma la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) llegaría a constituirse en un arma efectiva en la vigilancia de nuevas especies de *Leishmania sp.* que no han sido reportadas en Panamá y que existen en países vecinos. En este sentido podemos mencionar que a pesar que el vector más importante de la Leishmaniasis Visceral en América (*Lutzomyia longipalpis*) está presente en nuestro varios lugares de

nuestro país, la presencia de *Leishmania chagasi* no ha sido probada en nuestro medio, siendo necesaria una técnica de diagnóstico en vectores como la PCR para mantener un programa de vigilancia en nuestras zonas boscosas dirigido a detectar la presencia del agente etiológico de la leishmaniasis visceral

Capítulo VI

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

Consideramos que el presente trabajo cumplió con el objetivo principal del mismo el cual era el de validar la técnica de PCR para la detección de *Leishmania sp* en insectos vectores de leishmaniasis. De los resultados y discusión arrojados por el estudio podemos concluir lo siguiente:

- 1 La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *Leishmania sp* puede ser aplicada sobre un gran número de vectores de leishmaniasis sin que sea necesaria la disección de los insectos. Esto es de gran importancia en estudios epidemiológicos de la enfermedad cuando es necesario determinar las especies de *Lutzomyia sp* infectadas.
- 2 El método de extracción de ADN utilizando fenol-cloroformo resultó ser eficiente y sin ningún efecto adverso a la reacción de amplificación cuando fue aplicado sobre los grupos de *Lutzomyia sp*.
- 3 La prueba de PCR para *Leishmania sp* no mostró tener inhibidores de la *Taq* polimerasa cuando fue utilizada en muestras de *Lutzomyias* colectadas en el campo.
- 4 La PCR es una técnica que podría reemplazar los métodos convencionales de detección e identificación de patógenos en insectos vectores de enfermedades.

- 5 La PCR-RFLP nos permite diferencias entre las diferentes especies de *Leishmania* que han sido en Panamá

- 6 Este sistema de detección e identificación presenta la versatilidad de no sólo poder ser utilizado sobre insectos, sino que puede ser utilizado sobre muestras procedentes de animales reservorios de la enfermedad así como sobre muestras de pacientes

- 7 La comunidad de Santa Clara nº 2 junto al parque de Altos de Campana puede ser considerada como un área de riesgo para adquirir la leishmaniasis, de acuerdo a los resultados arrojados por el estudio

- 8 Los resultados negativos observados en los grupos de insectos del área de Gamboa no son concluyente debido al reducido número de grupos analizados

- 9 El porcentaje de infección observado en las *Lutzomyias* procedentes de la comunidad de Santa Clara nº 2 coincide con elevado número de casos de ese sector

Recomendaciones

- 1 Estimular el desarrollo de estudios sobre reservorios de leishmaniasis en la comunidad de Santa Clara n° 2 y en el parque Altos de Campana.
- 2 Realizar estudios sobre dinámica de poblacional de los vectores e identificación de reservorios de leishmaniasis en la comunidad de Santa Clara n° 2.
- 3 Crear una línea de investigación dentro del Programa Centroamericano de Maestría en Entomología en el cual se desarrollen proyectos de Entomología Molecular
- 4 Realizar un mayor número de colectas en el área de Gamboa para contar con una muestra más representativa del lugar y poder aplicar la técnica de PCR

Bibliografía

Bibliografía

1. **ADAMES, A.J.** 1997 Entomofauna de importancia medico-veterinaria en la cuenca hidrográfica del Canal de Panamá *Scientia*, 12(2):199-233.
2. **ADINI, I., JACOBSON, R.L., KASAP, M.Y.** 1998. Species-specific detection of *Leishmania* in sandflies using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans R. Soc Trop. Med Hyg* , 92:35-37.
3. **ALVAR, J.P.** 1997. Las Leishmaniasis. De La Biología al Control. Instituto de Salud Carlos III – España
4. **ARANSAY, A.M., SCOULICA, E., CHANIOTIS, B., TSELENTIS, Y.** 1999. Typing of sandflies from Greece and Cyprus by DNA polymorphism of 18S rRNA gene *Insect Mol Biol* , 8 179-184
5. **ARANSAY, A.M., SCOULICA, E., TSELENTIS, Y.** 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within natural infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA *App Enviroment Microb* , 66(5) 1933-1938.
6. **ARMED FORCES PEST MANAGEMENT.** 1998. TECHNICAL INFORMATION BULLETIN BOARD., Nov/Dec 11-12.
7. **ASHFORD, R.M.** 2000. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses *International Journal for Parasitology*, 30 1269-1281
8. **AVILES, H., BELLI, A., ARMIJOS, R., MONROY, F.P., HARRIS, E.** 1999. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador a comparison with classical diagnostic methods *J Parasitol.*, 85(2) 181-187

9. **BEATY, B.J., MARQUARDT, W.C. 1996.** The Biology of Disease Vectors
University Press of Colorado. 618 pp

10. **BEEBE, N.W., BAKOTE'E, B., ELLIS, J.T., COOPER, R.D. 2000.** Differential ecology of *Anopheles punctulatus* and three members of the *Anopheles farauti* complex of mosquitoes on Guadalcanal, Solomon Islands, identified by PCR-RFLP analysis *Med Vet Entomol* ,14(3).308-12.

11. **BELLI, A., RODRÍGUEZ, B., AVILES, H., HARRIS, E. 1988.** Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis *Am J Trop. Med. Hyg.*;58(1):102-109.

12. **BENECKE, M. 1998.** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophagous insects (diptera, coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice *Forensic Science International*, 98:157-168.

13. **BHATTACHARYYA, R., DAS, K., SEN, R., MAJUNDER, H.K. 1996.** Developmen of genus specific primer sert for detection of *Leishmania* parasites by polymerase chain reaction *FEMS Microbiology Letters*,195-200

14. **BREWSTER, S., ASLETT, M., BARKER, D.C. 1998.** Kinetoplast DNA minicircle database. *Parasitol Today*,14 437-438

15. **BRUCKERS, G. 1993.** Leishmaniasis in Latin America Department of Public Health and Tropical Medicine France 32 pag

16. **CONTRERAS, P. 1996.** Aspectos Epidemiológicos de la Leishmaniasis cutánea en un foco endémico de la provincia de Colón. Tesis Universidad de Panamá, República de Panamá

17. **CRAMPTON, J.M., BEARD, C.B., LOUIS, C. 1997.** The Molecular Biology of

18. **CHANIOTIS, B.N. 1974.** Use of external characters for rapid identification of Phlebotominae sandflies in vector studies. *J. Med Ent* ; 11(4) 501
19. **CHANIOTIS, B.N. 1974a.** Use of external character for rapid identification of phlebotomine sandflies in vector studies *J Med Entomol.*,11 501
20. **CHANIOTIS, B.N. 1974c.** Sugar feeding behavior of *Lu trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J. Med Entomol.*;11 73-79.
21. **CHANIOTIS, B.N., CORREA, M.A., TESH, R.B., JOHNSON, K.M. 1974b.** Horizontal and vertical movements of phlebotomine sandflies in panamenian rain forests *J Med. Entomol* ,11 369-375
22. **CHANIOTIS, B.N., NEELY, J.M., CORREA, M.A., TESH R.B., JOHNSON, K.M. 1971** Natural population dynamics of phlebotomine sandflies in Panama. *J Med Entomol.*, 8(4) 339-352
23. **CHRISTENSEN, H.A., FAIRCHILD, G.B., HERRER, A., JOHNSON, C.M., YOUNG, D.G., VÁSQUEZ, A.M. 1983.** The ecology of Leishmaniasis in the Republic of Panama *J. Med Entomol* , 20(5).463-484
24. **CHRISTENSEN, H.A., HERRER, A. 1980.** Development of a panamenian strain of *Leishmania mexicana* in co-indigenous *Lutzomyia sanguinaria* and *Lutzomyia gomezi* (Diptera Psychodidae) *J Med Entomol* ,19(2) 188-189.
25. **CHRISTENSEN, H.A., JOHNSON, C.M., VASQUEZ, A.M. 1983.** Leishmaniasis cutánea en Panamá *Revista Med de Panamá* , 9(3) 182-187
26. **DAVIES, J.B., OSKAM, L., LUJAN, R., SCHOONE, G.J., KROON, C.C.,**

- LOPEZ-MARTINEZ, L.A., PANIAGUA-ALVAREZ, A.J. 1998.** Detection of *Onchocerca volvulus* DNA in pools of wild-caught *Simulium ochraceum* by use of the polymerase chain reaction. *Ann Trop Med Parasitol*;92(3):295-304.
- 27. DAVILA, G. 1986.** Colonización de *Lu gomezi* (Diptera. Psychodidae) y su capacidad de picada frente a extractos de plantas *Momordica charantia* y *Genipa americana* como repelente. Tesis de Maestría Universidad de Panamá. Panamá
- 28. DAVILA, G., CHANIOTIS, B. 1988.** Comparación de métodos para colonización de *Lutzomyia* sp. (Diptera Psychodidae) en Panamá. *Scientia (Panamá)*. 3 (1) 61-65
- 29. DE BRUIJN, M.H., BARKER, D.C. 1992.** Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* 52:45-58
- 30. DENNIS LO, Y.M. 1998.** Clinical Applications of PCR. Humana Press Inc Totowa, New Jersey 353 pp
- 31. DESJEUX, P. 1994.** Information on the epidemiology and control of the Leishmaniasis by country or territory W.H.O 47 pag
- 32. DIAS, E.S., FORTES-DIAS, C.L., STITELER, J.M., PERKINS, P.V., LAWYER, P.G. 1998.** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lutzomyia longipalpis* laboratory populations. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 40(1) 16-23
- 33. ELDRIDGE, B.F., EDMAN, J.D. 2000.** Medical Entomology Kluwer Academic Publishers 659 pp
- 34. ESCOBAR, P. 1989.** Variación estacional, distribución vertical y actividad

rodontofílica de *Lutzomyia olmeca bicolor* y *Lu. panamensis* (Diptera: Psychodidae), Gamboa - Panamá. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Panamá 59 pp

35. **ESSEGHIR, S., FTAITI, A., READY P.D., KHDRAOUI, B., ZAAFOURI, B., DELLAGI, K., BEN-ISMAIL. R.** 1993. The squash blot technique and the detection of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi* in Tunisia Arch Inst Pasteur Tunis 70 493-496
36. **FAIRCHILD, G.B.** 1955. The relationships and classification of the Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Ann Ent Soc Am; 48 181-96
37. **FAJARDO, P.** 1991. Especies de *Lutzomyia* presentes en el ambiente intradomiciliar y peridomiciliar en un foco endémico de Leishmaniasis cutánea en Panamá Tesis de Maestría Universidad Nacional de Panamá 76 pp
38. **FARID, H.A., HAMMAD, R.E., HASSAN, M.M., MORSY, Z.S., KAMAL, I.H., WEIL, G.J., RAMZY, R.M.** 2001. Detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes by the polymerase chain reaction a potentially useful tool for large-scale control programmes Trans R. Soc Trop. Med Hyg ,95(1) 29-32
39. **FELICIANGELI, M.D., RODRÍGUEZ, N., BRAVO, A., ARIAS, F., GUZMÁN, B.** 1994. Vectors of cutaneous leishmaniasis in north-central Venezuela Med Vet Entomol., 8(4) 317-324
40. **FRANCO, Z., MOSQUERA, R.** 1999. Aspectos epidemiológicos de la Leishmaniasis en Panamá Caracterización de tres cepas de *Leishmania* Tesis Universidad de Panamá, República de Panamá
41. **GARCÉS, P.A., MORALES, Z. ARAUZ, E.** 2001. Determinación de Phlebotominae *Lutzomyia* spp , en un área boscosa del Parque Nacional Altos de

Campana, distrito de Capira, provincia de Panamá. *Scientia*;14(2):35-43.

42. GUEVARA, P., ALONSO, G., DA SILVEIRA, J.F., DE MELLO, M., SCORZA, J.V., ANEZ, N., RAMÍREZ, J.L. 1992. Identification of New World *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes *Mol Biochem. Parasitol* ,56:15-26.
43. HARRIS, E., KROPP, G., BELLI, A., RODRIGUEZ, B., AGABIAN, N. 1998. Single-Step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complex. *J. Clin Microbiol.*, 36(7):1989-1995
44. HERRER, A., CHRISTENSEN, H.A., BEUMER, R.J. 1973. Reservoir host of cutaneous *Leishmaniasis* among panamenian forest mammals. *Am. J Trop. Med. Hyg.*,22(5):585-591
45. HERTIG, M. 1942. *Phlebotomus* and Carrion's disease *Am. J. Trop. Med* ;22 (Suppl.)·1-80
46. HILL, S.M., CRAMPTON, J.M. 1994. DNA-based methods for the identification of insect vectors. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 88(3) 227-250
47. INFORME EPIDEMIOLOGICO DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES (*Leishmaniasis*). 1990. Ministerio de Salud, Departamento de Vigilancia F.P.R.S.E.
48. INFORME EPIDEMIOLOGICO DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES (*Leishmaniasis*). 1991. Ministerio de Salud, Departamento de Vigilancia F.P.R.S.E
49. INFORME EPIDEMIOLOGICO DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES (*Leishmaniasis*). 1992. Ministerio de Salud, Departamento de Vigilancia

F P R S.E

50. INFORME EPIDEMIOLOGICO DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES (Leishmaniasis). 1993. Ministerio de Salud, Departamento de Vigilancia F.P.R.S.E.

51. INFORME EPIDEMIOLOGICO DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES (Leishmaniasis). 1994. Ministerio de Salud, Departamento de Vigilancia F P R S.E

52. INFORME EPIDEMIOLOGICO DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES (Leishmaniasis). 1995. Ministerio de Salud, Departamento de Vigilancia F P.R S.E.

53. INFORME EPIDEMIOLOGICO DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES (Leishmaniasis). 1996. Ministerio de Salud, Departamento de Vigilancia F P R S E

54. INFORME EPIDEMIOLOGICO DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES (Leishmaniasis). 1997. Ministerio de Salud, Departamento de Vigilancia F.P R S E

55. INFORME EPIDEMIOLOGICO DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES (Leishmaniasis). 1998. Ministerio de Salud, Departamento de Vigilancia F P R S.E.

56. INFORME EPIDEMIOLOGICO DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES (Leishmaniasis). 1999. Ministerio de Salud, Departamento de Vigilancia F P R S.E

57. INFORME EPIDEMIOLOGICO DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES

(Leishmaniasis). 2000. Ministerio de Salud, Departamento de Vigilancia
F P R S.E

- 58. JACKSON, P.R., LAWRIE J.M., STITELER, J.M., HAWKINS, D.W., WOHLHIETER, J.A., ROWTON, E.D. 1986.** Detection and characterization of Leishmania species and strain from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA Vet. Parasitol., 20(1-3):195-215
- 59. JIMÉNEZ, A.E., ROJAS, J.C., VARGAS, F., HERRERO, M.V. 2000.** Temporal and spatial variation of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) community diversity in a cutaneous leishmaniasis endemic area of Costa Rica. J Med. Entomol ;37(2) 216-21
- 60. KILLICK-KENDRICK, R. 1999.** The biology and control of phlebotomine sandflies. Clin. Dermatol ,17.279-289
- 61. KILLICK-KENDRICK, R., PETERS, W. 1987.** The leishmaniascs in Biology and Medicine, vol I & II Academic Press, Inc , London, 944 pp
- 62. LANE, R.P., CROSSKEY, R.W. 1993.** Medical Insects and Arachnids, first edition. Chapman & Hall: 723 pp.
- 63. LEWIS, D.J., YOUNG, D.G., FAIRCHILD, G.B., MINTER, D.M. 1977.** Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera Psychodidae) Syst Entomol., 2 319-32
- 64. MALGORN, Y., COQUOZ, R. 1999.** DNA typing for identification of some species of Calliphoridae An interest in forensic entomology. Forensic Sci Int ,102(2-3):111-119
- 65. NIEVES, E., PIMENTA, P.F. 2000.** Development of Leishmania (Viannia)

braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) J Med Entomol.;37(1):134-140.

66. NOYES, H. A., REYBURN, H., BAILEY, J.W., SMITH, D. 1998. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. J. Clin Microbiol.;36:2877-2881.
67. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD 1990. Luchas contra las Leishmaniasis Informe de un comité de expertos de la OMS. Serie de informes Técnicos N° 793, 177 pp.
68. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1994. Leishmaniasis en las Américas Boletín Epidemiológico, O.P.S.;15(3) 8-13.
69. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 1996. Epidemiología y control de la Leishmaniasis en las Américas, por país o territorio Cuaderno Técnico n° 44, 44pp
70. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 1997. Métodos de Captura, Conservación y Montaje de los Flebotomos (Diptera: Psychodidae)
71. PASCALE, J.M., SOUSA, O.E., LÓPEZ, U. 1992. Clonaje de minicírculos de kADN en diferentes especies de *Leishmania* y su uso como sondas para diagnóstico Revista Médica de Panamá ;17(3):155-162.
72. PEREZ, J.E., OGUSUKO, E., INGA, R., LOPEZ, M., MONJE, J., PAZ, I., NIETO, E., ARÉVALO, J., GUERRA, H. 1994. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp in Peru. Trans. R Soc Trop Med Hyg., 88(2):161-164.
73. PETERSEN, J., JOHNSON, C.M., VASQUEZ, A.M., SAENZ, R. 1987.

Leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania mexicana amazonensis* en Panamá
Revista Médica de Panamá, 12:158-164.

74. RANSON, H., JENSEN, B., VULULE, J.M., WANG, X., HEMINGWAY, J., COLLINS, F.H. 2000. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids *Insect Mol Biol.*;9(5):491-7.
75. READY, P.D., SMITH, D.F., KILLICK-KENDRICK, R. 1988. DNA hybridizations on squash-blotted sandflies to identify both *Phlebotomus papatasi* and infecting *Leishmania major*. *Med Vet. Entomol* , 2:109-116
76. RODGERS, M.R., POPPER, S.J., WIRTH, D.F. 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania* *Exp Parasitol.*;71(3) 267-275.
77. RODRIGUEZ, N., AGUILAR, C.M., BARRIOS, M.A., BARKER, D.C. 1999. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop. Med Hyg* ;93:47-49
78. ROGERS, W.O., BURNHEIM, P.F., WIRTH, D.F. 1988. Detection of *Leishmania* within sandflies by kinetoplast DNA hybridization *Am. J Trop Med Hyg.*;39:434-439
79. ROZENDAAL, J.A. 1997. *Vector Control* World Health Organization 412 pp
80. SECCOMBE, A.K., READY, P.D., HUDDLESTON, L.M. 1993. A catalogue of Old World phlebotomine sandflies (*Diptera: Psychodidae, Phlebotominae*) *Occas Pap Syst Entomol* ,8 1-57
81. TESH, R.B. 1988. The genus *Phlebovirus* and its vectors. *Ann Rev Entomol.*;

33:169-181.

- 82. THEODOR, O. 1965.** On the classification of American Phlebotominae. *J Med Entomol* ,2 171-197
- 83. VASQUEZ, A.M., PAZ, H., ALVAR, J., PEREZ, D., HERNÁNDEZ, C. 1998.** Proyecto Leishmaniasis informe final Centro de Estudios Biomédicos y Biotecnología. Centro Conmemorativo Gorgas de estudios de la Salud, Panamá 100 pp.
- 84. VASQUEZ, A.M., PAZ, H., MENDEZ, E., ALVAR, J. 1994.** Leishmaniasis en Panamá Centro Conmemorativo Gorgas de investigación e información en Salud, Ministerio de Salud - Panamá Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo - España. 12 pp,
- 85. VASQUEZ, A.M., SAENZ, R.E., PETERSEN, J.L., CHRISTENSEN, H.A., JOHNSON, C.M. 1990.** Leishmania mexicana complex: Human infections in the Republic of Panama *Am. J Trop Med Hyg* ; 43(6) 619-622
- 86. WHO 1990.** Control of the leishmaniases. WHO Technical Report Series 793, WHO Geneva, 158 pp
- 87. WILSON, S.M. 1995.** DNA-based methods in the detection of Leishmania parasites: field applications and practicalities *Ann Trop Med Parasitol.*, 89 Suppl 1 95-100.
- 88. YOUNG D.G. 1994.** A Review of the Bloodsucking Psychodid Flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracidae) *Agric. Exp Stat* , IFAS, Univ. Florida, Gainesville, Tech Bull 806. 226 pp.
- 89. YOUNG D.G., DUNCAN M. 1994.** Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South

America (Diptera. Psychodidae). Mem. Am. Entomol. Inst.; 54:1-881.

90. **YOUNG, D.G., LAWYER, P.G. 1987.** New World vectors of the leishmaniasis. In Harris, KF (ed.) Current topics in vector research. Vol. 4. New York, Springer Verlag, Pp 29-71

91. **ZELEDON, R., MAINGON, R., WARD. R., ARANA, B., BELLI, A., DE CARREIRA, P., PONCE, C. 1993.** The characterization of Leishmania parasites and their vectors from Central America using molecular techniques Arch. Inst Pasteur Tunis,70(3-4).325-329.