

Informe final* del Proyecto CC005
Colección de referencia de vectores de Leishmania spp (causante de Leshmaniasis
cutánea localizada) de la Península de Yucatán y un estudio preliminar en un área
endémica de Quintana Roo

Responsable: Dra. Maria del Carmen Pozo de la Tijera

Institución: El Colegio de la Frontera Sur
Unidad Chetumal
Museo de Zoología

Dirección: Av Centenario km 5.5, Chetumal, Qroo, 77900 , México

Correo electrónico: cpozo@ecosur-qroo.mx; cpozo@flmnh.ufl.edu

Teléfono/Fax: Tel: 01(983) 835 0440 ext 230 Fax: ext 240 Tel. USA: 001 52 352 3737865

Fecha de inicio: Enero 14, 2005

Fecha de término: Abril 17, 2008

Principales resultados: Base de datos, Informe final

Forma de citar el informe final y otros resultados:** Sánchez García, L. y M. C. Pozo de la Tijera, 2008. Colección de referencia de vectores de Leishmania spp (causante de Leshmaniasis cutánea localizada) de la Península de Yucatán y un estudio preliminar en un área endémica de Quintana Roo. El Colegio de la Frontera Sur **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. CC005**. México D. F.

Resumen:

Proyecto financiado parcialmente por la Fundación Gonzalo Río Arronte La Colección de insectos flebótomos depositada ahora en la Colección Entomológica Regional (CER), fue creada en 1994 por el CIR "Dr. Hideyo Noguchi" como parte de los estudios llevados a cabo en el Programa de Estudio, Vigilancia y Control de la Leishmaniasis en la Península de Yucatán financiado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los primeros 400 especímenes de la colección en su totalidad pertenecen al área peri doméstica y selvática de "La Libertad" comunidad endémica de leishmaniasis en Campeche. El resto de los especímenes datan de colectas realizadas desde 2001 en un proyecto sobre la ecología de Lutzomyia olmeca olmeca financiado por OMS. Se tienen registros de localidades en los estados de Yucatán, Quintana Roo y Campeche, aunque existen una mayor cantidad de especímenes del último estado. Trabajos sobre vectores para Quintana Roo son escasos a pesar de que este es endémico de leishmaniasis con estadísticas superiores a las reportadas para Campeche (7). El reciente impulso del estudio de Leishmaniasis en reservorios huésped y humanos en el sur de Quintana Roo por parte de ECOSUR (unidad Chetumal) y al creciente interés tanto de ECOSUR como del CIR "Dr. Hideyo Noguchi" por el crecimiento y desarrollo de colecciones biológicas, se propone; crear la primera colección de entomología médica de reservorios de leishmaniasis para la Península de Yucatán, la identificación de las especies-vector antropofílicas y la incidencia natural del parásito. Chetumal es una población de Quintana Roo considerada de alta prevalencia e incidencia de leishmaniasis (8). Con el propósito de identificar la estacionalidad de contagio y la identificación de los vectores flebótomos hemofílicos, se proponen realizar muestreos mensuales con trampas de luz, Shannon y Disney de una semana de duración a lo largo de un año en la región selvática y de uso agrícola y agropecuario del área peri-urbana de Chetumal. Los ejemplares serán determinados por un especialista y de ellos el 20% se analizará para corroborar la presencia del parásito y poder conocer el índice de incidencia. El parásito se identificará mediante el uso de las técnicas moleculares PCR y DGGE. Como especies antropofílicas potenciales a reportar están; L. cruciata, L. olmeca olmeca, L. panamensis, L. shannoni y L. ovallesi. Los ejemplares recolectados, se ingresarán al catálogo escrito de la Colección de Artrópodos (insectos y arañas) de ECOSUR. La base de datos contendrá la información de los ejemplares recolectados y los ya existentes en la colección CER. Se capturarán los datos de todos ellos en Biótica 4.1 y se depositarán en ambas colecciones por duplicados. Se espera lograr una base de datos con 10,784 registros de la UADY y otra con 4,500 registros de ECOSUR.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR UNIDAD CHETUMAL
COMISIÓN NACIONAL PARA EL USO Y CONOCIMIENTO DE LA
BIODIVERSIDAD

“Colección de Referencia de Vectores de *Leishmania spp.* (causante de Leishmaniasis cutánea localizada) de la Península de Yucatán y un estudio preliminar en un área endémica de Quintana Roo”

INFORME FINAL DE ACTIVIDADES

Proyecto CC005

Responsables del Proyecto
M. en C. Laura Sánchez García
Dra. Carmen Pozo de la Tijera

Colaborador-responsable de la base CER-UADY
Dr. Eduardo A. Rebollar Téllez

Participantes
ECOSUR
Biol. Emigdio May Uc
Biol. Jesús V. Miss Domínguez
Biol. Blanca Prado Cuellar
Biol. Noemí Salas Suárez

Secretaria de salud del Quintana Roo
M. en C. Marco Domínguez Galera
Biol. Pedro Mis Ávila

Chetumal, Quintana Roo, 21 de marzo de 2007

RESUMEN

Se reportan un total de 15 especies de flebotominos para la zona periurbana de Chetumal, dentro de las cuales *Lutzomyia olmeca olmeca*, *Lutzomyia cruciata*, *Lutzomyia shannoni* y *Lutzomyia deleoni* contribuyeron con el 95.7% de la captura total. Los picos de abundancia de las especies dominantes se registraron durante los meses de julio-agosto 2005, noviembre 2005 y febrero 2006. Se considera que la zona norte presenta un mayor riesgo de contagio de la leishmaniasis debido al tipo de vegetación presente; selva mediana subperennifolia y bosque secundario de 18-25 años. La amplificación del cinetoplasto del parásito por la técnica PCR indica la presencia de *Leishmania* en los flebotominos; *Lutzomyia olmeca olmeca*, *Lutzomyia shannoni* y *Lutzomyia cruciata*, la amplificación de la región del espaciador transcrito interno (ITS) y la región final del gen ribosomal 18S identificaron a *Leishmania (Leishmania) mexicana* como la especie involucrada en el ciclo de la transmisión de la LCL (Leishmaniasis Cutánea Localizada (úlceras del chiclero) en la zona periurbana de Chetumal. Con relación a las colecciones de entomología médica computarizadas en BIOTICA 4.1 se reporta un total de 17,747 registros de especímenes de flebotominos para la península de Yucatán distribuidos en 18 especies.

Comparación de los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto y los comprometidos en el convenio.

ACTIVIDAD	COMPROMISO CC005	RESULTADOS CC005
EJEMPLARES COLECTADOS DE FLEBOTOMINOS	9000	11445
BASE DE DATOS BIOTICA 4.1 (incluye datos de ejemplares colectados y actualización de base de datos CER)	15284	17747
NOMENCLATOR	6 registros	32 registros
Índice de infección	1200	1301
No de colectas	12	12
Productos		Una tesis de licenciatura Dos artículos de divulgación científica

INTRODUCCIÓN

Se le conoce como leishmaniasis a una serie de manifestaciones clínicas producidas por un parásito protozoario tripanosomátido del género *Leishmania*. En general las manifestaciones clínicas de esta enfermedad se congregan en tres categorías: Leishmaniasis visceral (LV), Leishmaniasis cutánea (LC) y Leishmaniasis mucocutánea (LMC) (WHO, 2002). En México la leishmaniasis se considera un problema de salud pública, y se identifica que la región sureste del país (península de Yucatán) es endémica de la leishmaniasis principalmente la cutánea localizada. En este trabajo se enfatiza en el estudio de los vectores involucrados en la transmisión de la leishmaniasis cutánea localizada en la zona periurbana de Chetumal. De los estudios realizados en la península de Yucatán, destaca la siguiente información; a) la

identificación de las especies hemofílicas que intervienen en la transmisión de la leishmaniasis (Biagi y Biagi, 1953, Biagi y Biagi, 1965). b) El estudio de focos de infección en Campeche principalmente en las comunidades de La Libertad, La Guadalupe y Dos Naciones. Resaltando los trabajos relacionados con el conocimiento de la composición de especies de flebotominos, su distribución, patrones de transmisión, distribución estacional y ecología general, la identificación de los posibles sitios naturales de reposo y oviposición, la asociación de reservorio-vector, biorritmos de picadura relativos a la humedad relativa y temperatura. La determinación de la infección natural utilizando técnicas microscópicas (Cruz-Ruiz, 1994, Rebollar-Téllez y col., 1996 a, b, c, Tun, 2004). Para el estado de Quintana Roo son pocos los trabajos publicados y estos se resumen en el reporte de *Lutzomyia olmeca olmeca* como la especie antropofílica involucrada en la transmisión de la leishmaniasis (Biagi y Biagi 1965, Valdespino y col., 1994).

De acuerdo a las estadísticas de la secretaria de salud del estado de Quintana Roo para este, se reporta el mayor número de casos de leishmaniasis por año (SESA, 2004 datos no publicados). La zona sur y en particular Chetumal y su zona con-urbana, presentan uno de los mayores valores, sugiriendo así, que la zona periurbana de Chetumal era un sitio atractivo de estudio no solo por el número de casos si no también por el estrecho contacto de los vectores con la población urbana.

Por otro lado el diagnóstico acertado de la leishmaniasis es crítico debido a que el tratamiento de esta enfermedad es costoso, de larga duración y está asociado a efectos tóxicos colaterales que ponen en peligro la salud del paciente, también la identificación adecuada de las diferentes especies es sumamente conveniente debido que cada una

requiere tratamiento diferencial (Grimaldi y Tesh, 1993). Así mismo la identificación de las especies es necesaria en estudios epidemiológicos (la documentación de la distribución de las especies) y en el diseño de programas de control. Los métodos de diagnóstico clásicamente utilizados (métodos directos; ATL, tinción de Giemsa, métodos indirectos; reacción de Montenegro) son relativamente específicos, pero su sensibilidad varía de manera importante dependiendo de la experiencia del técnico que realice la interpretación, y aunque permiten en la mayoría de los casos permite diagnosticar el padecimiento (40% de exactitud) no siempre es posible confirmar la presencia del parásito. Durante la última década se han realizado progresos importantes en el diagnóstico de esta enfermedad principalmente con el uso del ácido nucleico del patógeno. La técnica de la PCR es uno de los métodos más utilizados pues es rápido, sensitivo, específico y de bajo costo. Esta técnica ha demostrado ser útil en el diagnóstico de diferentes formas clínicas de la enfermedad usando diferentes secuencias de oligonucleótidos, se ha utilizado en la identificación de *Leishmania* a nivel de género (Rodgers y col., 1990, Smyth y col., 1992, De Bruijn y col., 1993, López y col., 1993, Mathis y Deplazes, 1995, Battacharyya y col., 1996) y para la caracterización de complejos individuales como por ejemplo *Leishmania (Viannia) braziliensis* (De Bruijn y Barker, 1992, Guevara y col., 1992, Rodríguez y col., 1994) y *Leishmania (Leishmania) mexicana* (Meredith y col., 1993, Eresh y col., 1994 Berzunza y col., 2005, Kato y col., 2005) sin embargo, la sensibilidad y especificidad de la técnica para la detección del parásito depende de la secuencia de los oligos utilizados.

El desarrollo de este proyecto contribuyó al conocimiento de las especies de flebotominos presentes en el área periurbana de Chetumal, su distribución espacial y mensual, la identificación de los picos de abundancia, la

estructura comunitaria en términos de abundancia y diversidad, la identificación de las especies hemofílicas, el índice de infección de *Leishmania*, así como la creación de las primeras colecciones de entomología medica para la península de Yucatán que incluyen flebotominos.

OBJETIVOS

Generales

- 1.- Establecimiento de las primeras colecciones de flebotominos para la Península de Yucatán.
- 2.- Establecer el índice de infección en los vectores potenciales de *Leishmania spp.*
- 3.- Determinar la (s) especie (s) de *Leishmania spp.*, que pudieran estar involucradas en el ciclo de transmisión de la LCL en la zona periurbana de Chetumal.

Particulares

- 1.- Obtener la lista de especies de flebotominos presentes en la península de Yucatán como producto de la actualización de la base de datos de Colección de Entomología Regional (CER) de la Universidad Autónoma de Yucatán. Así como la lista de especies de la zona periurbana de Chetumal.
- 2.- Determinar la variabilidad espacial y temporal de la abundancia y riqueza de los flebotominos del área periurbana de Chetumal.
- 3.- Descripción de la estructura comunitaria de los flebotominos en términos de la abundancia, diversidad y la riqueza específica.
- 4.- Identificar las especies vectores potenciales de *Leishmania spp.*
- 5.- Diagnósis de la (s) especie (s) de *Leishmania spp.* por métodos moleculares en cada individuo capturado y destinado para PCR.
- 6.- Identificación de los focos potenciales de infección dentro del área periurbana de Chetumal.

ÁREA DE ESTUDIO

El área periurbana de Chetumal tiene una superficie total de 17, 266.3 hectáreas, y esta conformada por cuatro localidades: Calderitas, Huay- Pix, Xul-Há y Subteniente López (Programa de Desarrollo Urbano de la Zona Metropolitana de Chetumal, Calderitas y Xulha, 2005 publicado en el Diario Oficial de la Federación, 2005.). Existe una conurbación física entre Chetumal y Calderitas, de hecho esta población se considera una colonia de Chetumal, aún cuando esta mantiene cierta funcionalidad propia. Las otras tres localidades Huay-Pix, Xul-Há y Subteniente López aún no presentan el fenómeno de la conurbación física, pero si funcional, ya que interactúan con la capital del estado en forma intensa y se constituyen como suburbios funcionales. Sin embargo, aún conservan el carácter de asentamientos rurales con bajo desarrollo urbano (figura 1).

Clima

En el área metropolitana de Chetumal ocurre el mismo tipo de clima cálido húmedo intermedio con lluvias intensas en verano que se presenta en la mayoría del territorio del municipio de Othón P. Blanco. Si bien se cuenta con una época de lluvias fuertes en verano, también se presentan precipitaciones en todos los meses, aún en los que se toman como los más secos, marzo y abril. Las temperaturas medias que se registran oscilan entre 22 y 26° C con una precipitación entre 1,100 y 1,300 mm anuales.

Topografía

La topografía de la ciudad y de su entorno inmediato es básicamente plana con pendientes en todos los casos inferiores al 5%. Sin embargo, se presentan algunas depresiones en las que se localizan humedales, principalmente en los límites noroeste de Chetumal, sureste de Subteniente López y al norte de Huay- Pix, que propician inundaciones en épocas de lluvias.

Vegetación

El tipo de asociación vegetal presente es la selva mediana subperennifolia altamente modificada, donde se observa la presencia de algunos árboles de los estratos arbóreo, arbustivo y herbáceo originales. Entre los ejemplares más numerosos encontrados en la zona periurbana destacan como parte de la vegetación secundaria las especies: Habin (*Piscidia piscipula*); Caracolillo (*Sideroxylon foetidissimum*); Katalox (*Swartzia cubensis*); Hualla (*Talisia olivaeformi*), Ramón (*Brosimum alicastrum*); Kanisté (*Poteria campechiana*); Huano (*Sabal yapa*); Caoba (*Swietenia macrophylla*); Chichibe (*Sida acuta*); Zapote (*Manilkara zapote*)

Fauna

Principalmente se observa fauna urbana asociada directamente a los humanos sin embargo la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Diversidad (CONABIO), reporta especies de mamíferos como las de mayor importancia en la porción aledaña a las localidades del área que aún conservan restos de selva o aún dentro de las zonas habitacionales. Este grupo no presentan migración frecuente, y si en cambio tienden a perecer por cambios ambientales extremos, por lo que funcionan como indicadores de la estabilidad metabólica. Entre las principales especies de mamíferos destacan el pecari (*Tayassu pecari*), tejón (*Bassariscus sumichrasti*), mapache (*Procyon lotor*), ocelote (*Leopardus pardalis*), jaguar (*Panthera onca*),

tlacuahes (*Didelphis marsupialis*), roedores silvestres; ratón de campo (*Oligoryzomys fulvescens*), rata arborícola (*Otonyctomys hatti*), rata arborícola (*Ototylomys phyllotis*), ratón de campo (*Peromyscus yucatanicus*), ratón de campo (*Reithrodontomys gracilis*), rata cañera (*Sigmodon hispidus*), ardilla arborícola (*Sciurus deppei*) y ardilla negra (*Sciurus yucatanensis*) .

MÉTODOS

Para la selección de sitios se realizaron dos salidas de campo en el mes de febrero 2005, la selección se realizó con base en la presencia de áreas de selva mediana subperennifolia relativamente conservada y bosque secundario de mas de 10 años, la presencia de árboles caídos, refugios de roedores y humedad del sustrato medida con base a la cantidad de hojarasca presente. La elección de los sitios y caracterización se realizó con la ayuda del Sr. Margarito Tuz, técnico de ECOSUR con basta experiencia en el estudio de la vegetación arbórea y herbácea. Durante el año de muestreo (marzo 2005-febrero 2006) se visitaron 19 sitios, cada mes se visitaron dos sitios diferentes con el propósito de lograr mayor diversidad para las colecciones CER-UADY y de Insectos- Arañas de ECOSUR. El tiempo de colecta por persona en horas fue de 168 y se requirió de la participación de 10 personas (= 1,680 horas-humano); en cada salida se requerían de 4-6 personas por cada noche de colecta, para cada sitio de colecta se registró el tipo de trampa, hora de captura y la especie capturada así como la clave de identificación (ID) del área, y el nombre de los colectores por cada salida de colecta (tabla 1, Apéndice I). Los registros de humedad relativa, temperatura y dirección del viento, fueron proporcionados por la estación meteorológica de la Comisión Nacional del Agua (CNA) en la zona sur y de ECOSUR-Ch para la zona norte.

Diseño de muestreo

Las áreas de muestreo se eligieron con base en su ubicación cardinal (figura1) y se denominaron norte (N), sur (S), nor-oeste (NO), nor-este (NE), sur-este (SE), sur-oeste (SO). En cada área se colectaron muestras en diferentes sitios en al menos una vez cada dos meses. Cada sitio de muestreo se caracterizo por el tipo de vegetación (desde bosque secundario de mas de 10 años a selva mediana subperennifolia bien conservada), humedad del suelo, presencia de árboles caídos y refugios de roedores, de tal modo que cada uno de ellos fuera comparable independientemente del área. Una vez que se seleccionaron los sitios se procedió a establecer transectos de 15 m, marcando estaciones de trampeo cada 5 m, cada trampa era colgada a cada lado del transecto de manera intercalada; una trampa de luz CDC y una trampa Disney. Todo esto con el propósito de minimizar la probabilidad de que la captura de los flebotominos estuviera influenciada por el sitio específico de colecta. La trampa Shannon se colocó una distancia no menor de 500 metros del punto más cercano al transecto (figura 2). Para la colocación de esta trampa se requirió limpiar de vegetación un área de aproximadamente 4.5 m² por noche, por razones conservacionistas y de respeto al dueño del predio se decidió limitar al mínimo el intercambio de sitio de colocación de esta trampa.

Recaracterización de los sitios de muestreo.

Debido a las diferencias encontradas en los sitios de colecta con relación al tipo de vegetación reportado (la caracterización se definió con base a las cartas “tipo de vegetación y uso de suelo” del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) como selva mediana subperennifolia) respecto del observado en campo se considero importante la revisión de la caracterización arbórea y arbustiva de cada sitio, pues resulto que el tipo de vegetación marco una diferencia importante tanto en la abundancia como en la composición de la riqueza específica dentro de la zona norte y sur. Para cada sitio de colecta se caracterizo la vegetación

arbórea, arbustiva y herbácea. La metodología fue marcar cuadrantes de 20 x 20 m y contabilizar el número de especies de árboles encontradas. La distribución de los 19 sitios de colecta se ilustra en la figura 1.

Zona Sur.

Comprende la región del río Hondo. Esta área está mayormente representada por acahuales de selva mediana subperennifolia (bosque secundario) entre 10 a 15 años de edad con áreas de inundación, el sitio denominado como S5 fue el único que presentó bosque secundario de 15-20 años de edad, el promedio de la altura arbórea fue de 7.44 m. Las principales especies de árboles registradas fueron: Zapotillo (*Pouteria aereolata*), Chechem (*Metopium brownei*), X-ch'iich bob (*Cocoloba ortizii*), Sak paj (*Byrsonima bucidaefolia*), Boob (*Cocoloba cozumensis*), Negrito (*Simarouba glauca*), Ya' axnik (*Vitex gaumeri*), Laurelillo (*Conocarpus erectus*), Mahaua (*Hampea tribolata*), Nance (*Byrsonima crassifolia*), Chakah (*Bursera simarouba*), Dzalam (*Lysoloma latisiliqua*), Siliil (*Diospyros cuneata*). Los sitios de colecta fueron: S1 a S7.

Zona Norte.

La mayor parte de esta zona está representada por el ejido Calderitas, se caracteriza principalmente por presentar zonas de selva mediana subperennifolia bien conservada. El buen estado de salud del área lo determinó la presencia del sak-chakah (*Dendropanax arboreus*), la altura promedio de las especies presentes fue de 11 m. Las especies de árboles que se registraron en el área fueron: Boob (*Cocoloba cozumensis*), Chechem (*Metopium brownei*), Siliil (*Diospyros cuneata*), Ja' abin (*Piscidia piscipula*), K' anasim (*Lonchocarpus yucatanensis*), Chakah (*Bursera simarouba*), Dzalam (*Lysoloma latisiliqua*), Boob (*Cocoloba cozumensis*), Ya' axnik (*Vitex gaumeri*), K' atal oox (*Swartzia cubensis*), Caimito (*Chrysophyllum cainito*), Zapote (*Minilkara zapota*), Ta' tsi (*Nea amplifolia*), Sabakché (*Exostema caribaeum*), K' anchunup (*Thovinia tomocarpa*), Verde

lucero o Ya' ax ek (*Blepharidium mexicanum*), Sak paj (*Byrsonima bucidaefolia*), K' anisté (*Pouteria campechania*), Perescut (*Croton spp.*), X-ch'iich bob (*Cocoloba ortizii*), Joochock ché (*Nectandra coriacea*), Huaya (*Talisia olivaeformis*), Chikbo (*Cocoloba cozumensis*), Dzinche (isinche) (*Caesalpinia yucatanensis*), Negrito (*Simarouba glauca*), Mahaua (*Hampea tribolata*), Sak chakah (*Dendropanax arboreus*). Los sitios de colecta de esta zona son: N1, N2, N3, N9, N10, N11.

Zona Noreste.

Comprendida por parte del ejido Calderitas y terrenos de la zona conurbana de la colonia Nuevo Progreso. La mayoría de los terrenos en el área presentan vegetación de selva mediana subperennifolia bien conservada, sin embargo, debido al crecimiento poblacional el número de predios desmontados para cultivo se incrementó de manera importante al menos durante el año de colecta, la altura promedio arbórea fue de 11.23 m. Las especies arbóreas reportadas para el área fueron: Chakah (*Bursera simarouba*), Cocoloba (*Cocoloba cozumensis*), Ya' axnik (*Vitex gaumeri*), Dzalam (*Lysoloma latisiliqua*), K' atal oox (*Swartzia cubensis*), Perescush (*Croton glabellus*), Siliil (*Diospyros cuneata*), Joochock ché (*Nectandra coriacea*), Ja' abin (*Piscidia piscipula*), Chechem (*Metopium brownei*), Negrito (*Simarouba glauca*). Los sitios de colecta de esta zona son: N4, N5, N7 y N8.

Zona Noroeste.

Comprende el ejido de Subteniente López. Esta zona es heterogénea debido a la diversidad de ambientes entre los que destacan lagunas temporales, selva mediana subperennifolia conservada, y acahuales (bosque secundario) entre los 18-25 años de edad. La altura promedio de vegetación fue de 9.17 m. Los sitios de colecta que pertenecen a esta zona fueron: N6 y N12. En esta área se destaca la presencia de: Boob (*Cocoloba spicata*), Chakah (*Bursera simarouba*), Hupich (*Albizia tomentosa*), Negrito (*Simarouba glauca*), Siliil (*Diospyros cuneata*), K' anisté (*Pouteria campechania*), Ja' abin(

Piscidia piscipula), X-ch'iich bob (*Cocoloba ortizii*), Ya' axnik (*Vitex gaumeri*), Sak chakah (*Dendropananx arboreus*), K' anasim (*Lonchocarpus yucatanensis*), Huaya (*Talasia olivaeformis*), Joochock ché (*Nectrandra coriacea*), Huano (*Sabal japa*), Chechem (*Metopium brownei*), Perescut (*Croton spp.*).

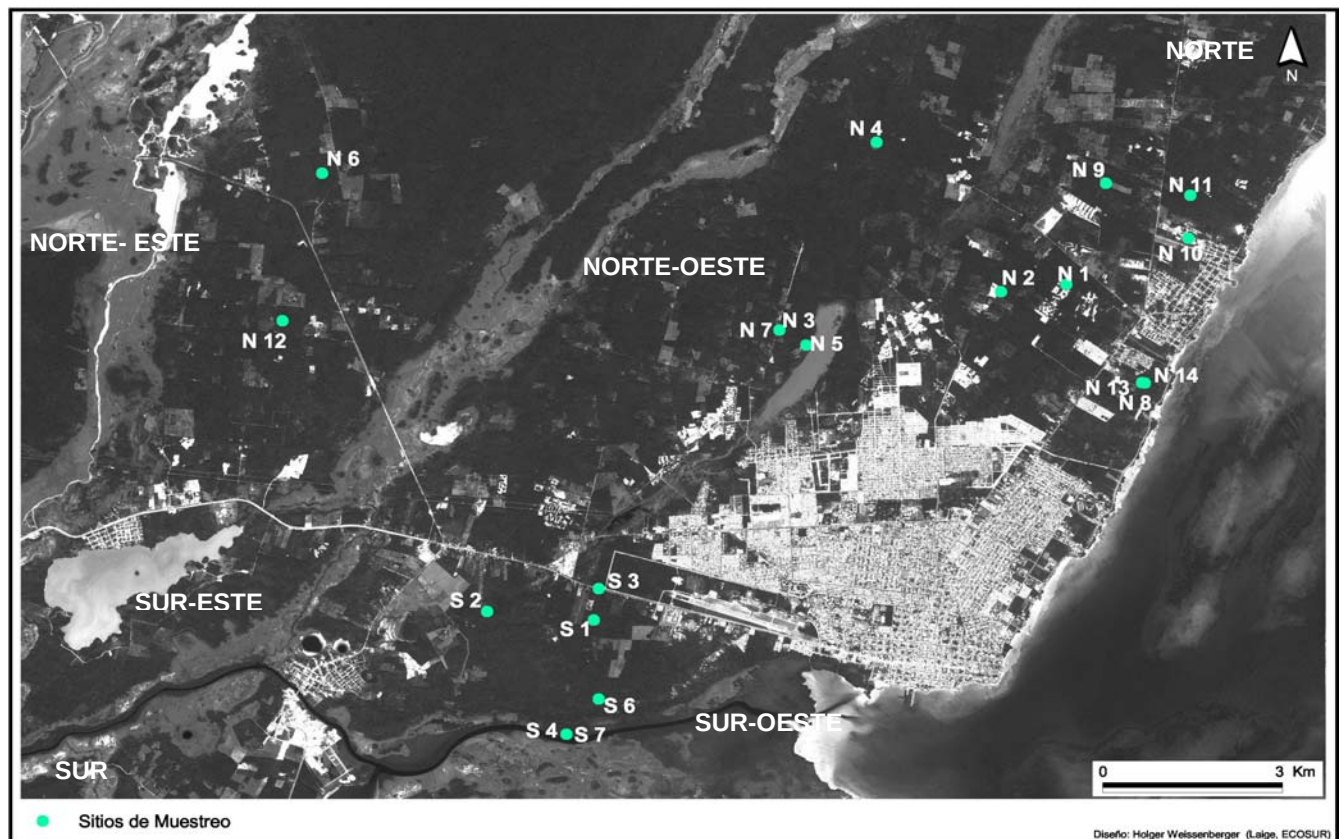


Figura 1. Distribución de los sitios de muestreo para la colecta de flebotominos en el area periurbana de Chetumal. Imagen digital fue donada por la secretaria de desarrollo urbano municipal.

DISEÑO DE MUESTREO

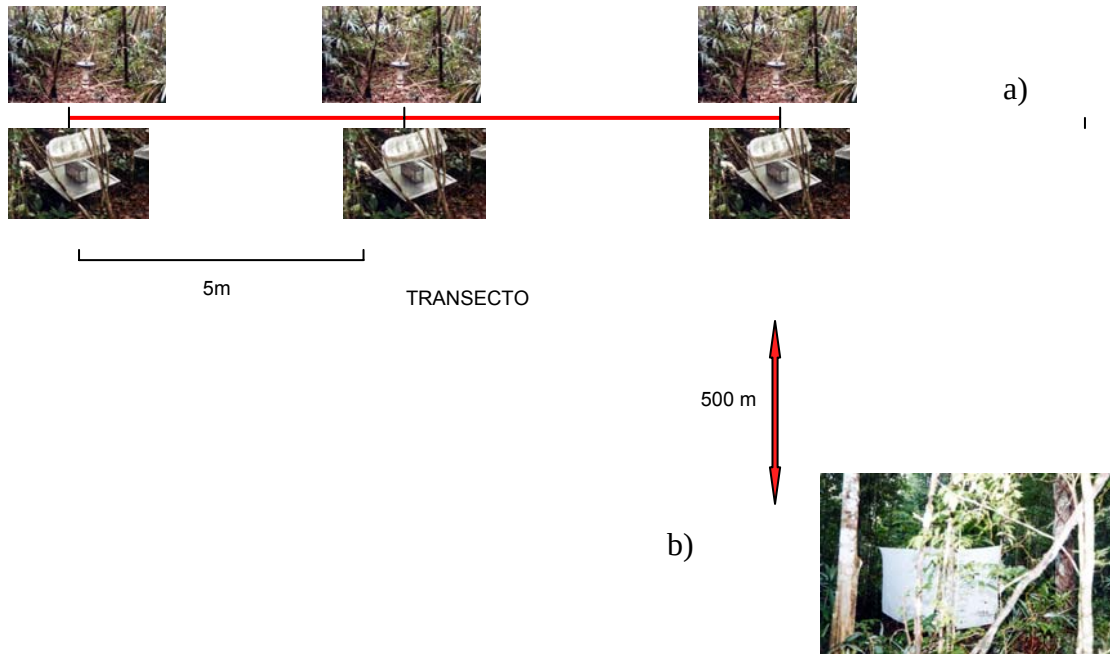


Figura 2. Diseño de muestreo. a) Transecto de 15 m con trampas ó CDC y Disney, b) Trampa Shannon

TÉCNICAS DE MUESTREO

Como se mencionó anteriormente, para la capturas de flebotominos se utilizaron las trampas Disney, Shannon y CDC.

La trampa Disney (Disney 1966) consiste de una charola de aluminio de 50 x 50 cm. impregnada de aceite de castor (Riedel-de Haën; Seelze, Suiza); sobre la cual se coloca una jaula de 15 x 7 x 5 cm con un roedor que funciona como cebo (figura 3a). Por encima de la charola se coloca otra charola de aluminio para proteger la captura y al roedor de la lluvia. Las especies utilizadas como cebo fueron *Heteromys gaumeri* y *Sigmodon hispidus*, el cebo despiden una pluma de olor que atrae a las hembras de flebotominos. Las trampas fueron suspendidas a una altura de aproximadamente 50 cm sobre el nivel del suelo atadas de la rama de un

árbol. El vuelo característico de los flebotominos consiste en saltos cortos lo cual permite que al ser atraídas por el cebo se posen en la superficie de la charola de aluminio y queden atrapadas en la superficie impregnada con el agente pegajoso. Estas trampas fueron colocadas de 18:00 a 22:00 horas. Los flebotominos adheridos se retiraron cuidadosamente con la ayuda de pinzas entomológicas y colocados en alcohol al 70%, las especies destinadas para PCR se conservaron en alcohol al 80%. En cada sitio de muestreo se colocaron 5 trampas por noche.

La trampa Shannon consiste en una caja grande elaborada de manta (figura 3b) que puede ser de dimensiones variables, la utilizada en este estudio fue de 2.5 x 1.65 x 1.5 m, en dicha caja pudieron estar cómodamente sentadas 3 personas. La trampa se sujeto con cuerdas a los árboles circunvecinos y se suspendió a una altura de 40-50 cm. del suelo. El principio de funcionamiento se basa en los olores volátiles, emanados y exhalados por las personas que permanecen dentro de la trampa, los flebotominos hembras que se encuentren en la proximidad se ven atraídas por esta “pluma de olor”. Las hembras atraídas al interior de la trampa son capturadas con un aspirador bucal de vidrio en cuyo extremo próximo se le coloca una tela de tul como filtro. La tendencia de las hembras a volar hacia arriba facilita su captura en las paredes de la trampa. El tiempo de captura fue de cuatro horas (de 18:00 a 22:00 horas) empleando contenedores de vidrio para separar el material colectado por hora. Para las capturas en esta trampa se invirtieron un total de 672 horas, en cada sitio de colecta se colocó una trampa Shannon. Posterior a la colecta los especímenes se transfirieron cuidadosamente a tubos Eppendorf que contenían alcohol al 70%, las seleccionadas para PCR se conservaron en alcohol al 80%.

La trampa CDC (Centre for Disease Control) es un modelo utilizado para la captura de mosquitos y otros dípteros hematófagos nocturnos. La trampa consiste de un atrayente lumínico: un foco de 6.3V (Sudia y Chamberlain, 1962). Los insectos son atraídos por la luz del foco y succionados hacia el interior de un colector por medio de un ventilador (figura 3c). El ventilador y la

fuentes lumínicas son alimentados por una batería recargable de 6V. La trampa se protege de la lluvia con un disco de plástico en la parte superior. Las trampas de luz se colocaron a una altura de 50 cm. del suelo, el tiempo de captura fue de las 18:00 a las 22:00. Para cada uno de los sitios se utilizaron 5 trampas.



a



b



c

Figura 3. Método de recolección de flebotominos en el área periurbana de Chetumal. a) Trampa Disney (Disney, 1966)., b) Trampa Shannon, c) Trampa CDC.

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE INFECCIÓN.

Para lograr este objetivo se propuso utilizar la técnica molecular “Reacción en Cadena de la Polimerasa” (PCR de sus siglas en ingles) debido a que es un método rápido, sensible y de diagnóstico específico, el cual puede ser

utilizado en análisis masivos y en campañas de control del insecto (Reithinger y col., 2000). Para la identificación del genero se eligió una región conservada del minicírculo del cinetoplasto denominada L.MC-1S-5'CTRGGGGTTGGTGTAATAAG-3' y L.MC-1R-5'TWTGAACGGGRTTTCTG- 3' la cual fue utilizada para la diagnosis de *Leishmania spp.* en flebotominos en la región andina del Ecuador (Kato y col., 2005). Para la extracción del ADN así como para la amplificación de los oligos específicos se siguió el protocolo propuesto por Kato y col., (2005).

Para la determinación de la especie de *Leishmania (Leishmania) mexicana* se amplificó la región del ITS (espaciador transcrito interno) y la región final del 18S de los genes del ADN ribosomal con los oligos IR1 (5'-GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT-3') y LM17 (5'-CCCCTCTCCTCCTCCCC- 3') (Copulillo y col., 1995, Berzunza y col., 2005). Para cada reacción se incluyo un control positivo (MC): aislado de paciente con leishmaniasis cutánea localizada de *Leishmania (Leishmania) mexicana* donada por la Dra. Berzunza (Laboratorio de Inmunología de la Unidad Experimental de la Facultad de Medicina-UNAM), y un control negativo del sistema (agua destilada sustituyendo al ADN).

Para la determinación del índice de infección se realizaron capturas exclusivas en cada uno de los sitios, donde se realizaron las colectas para la captura de los flebotominos destinados para las colecciones entomológicas. Para las colectas se utilizaron dos trampas CDC una Disney, y la captura de una sola persona en la trampa Shannon.

El hecho de colectar muestras de flebotominos exclusivas para la determinación del índice de infección se basó en la preocupación del personal de la CONABIO por mantener intactas las muestras destinadas para la colecciones CER-UADY e "Insectos y Arañas"-ECOSUR-Ch.

Para determinar el éxito de la extracción de ADN se utilizó como control positivo una secuencia conservada del gen del 18S rRNA propuesta por Kato y col., 2005 para este fin. La secuencia de los oligos es la siguiente Lu. 18S

rRNA-1S (5'-TGCCAGTAGTTATATGCTTG-3') y Lu. 18S rRNA-1R (TTACGCGCCTGCTGCCTTCC-3'), las condiciones para la amplificación fueron las mismas utilizadas para la identificación del género. Como control positivo del sistema de PCR se utilizó ADN de cucaracha (*Periplaneta americana*) y como control negativo agua. Se amplificó el ADN de solo 120 especímenes, muestra que se consideró representativo para la comprobación del éxito de la extracción de ADN.

Para la identificación de cada espécimen utilizado para el diagnóstico de *Leishmania* se utilizaron las claves de Young y Perkins (1984), Young y Duncan (1994) e Ibáñez Bernal S. (2002, 2005), cada espécimen para PCR se disecó en tres partes; la cabeza y los tres últimos segmentos se destinaron para la identificación mientras que el tórax y el abdomen se utilizó para el diagnóstico del parásito.

IDENTIFICACIÓN DE LOS FLEBOTOMINOS

Para la identificación de cada espécimen se utilizaron las claves de Young y Perkins (1984), Young y Duncan (1994) e Ibáñez Bernal S. (2002, 2005). Cada espécimen se colocó en una solución de hidróxido de sodio al 10% (P/V) con el propósito de transparentarlos (degradación del músculo) Una vez aclarados se procedió a enjuagarlos con agua destilada y se prepararon para la deshidratación con diferentes concentraciones alcohol (70, 80 y 100%) después de la deshidratación se procedió al montaje utilizando la resina sintética Euparal (BIOQUIP). Las estructuras que se observaron para los machos fueron; la terminalia, los mechones de cada cerda presente, el gonoestilo, el gonocoxito, la bomba espermática y los ductos eyaculadores (figura 4a). Para las hembras fue la espermateca (figura 4e), el número y disposición de los dientes del cibario (Figura 4d, f). Tanto para las hembras como para machos se observaron los ascoides del segundo segmento antenal (figura 4c). Los ejemplares se depositaron en las colecciones de ECOSUR y UADY. Durante el curso de este proyecto se ofrecieron dos

talleres relacionados con la identificación de los flebotominos esto con el propósito de adiestrar a los técnicos y colaboradores lo mejor posible, los talleres fueron impartidos por el Dr. Sergio Ibañez Bernal y el Dr. Eduardo Rebollar Téllez. Cada especie reportada en este trabajo fue corroborada por el taxónomo experto en flebotominos el Dr. Sergio Ibañez Bernal.

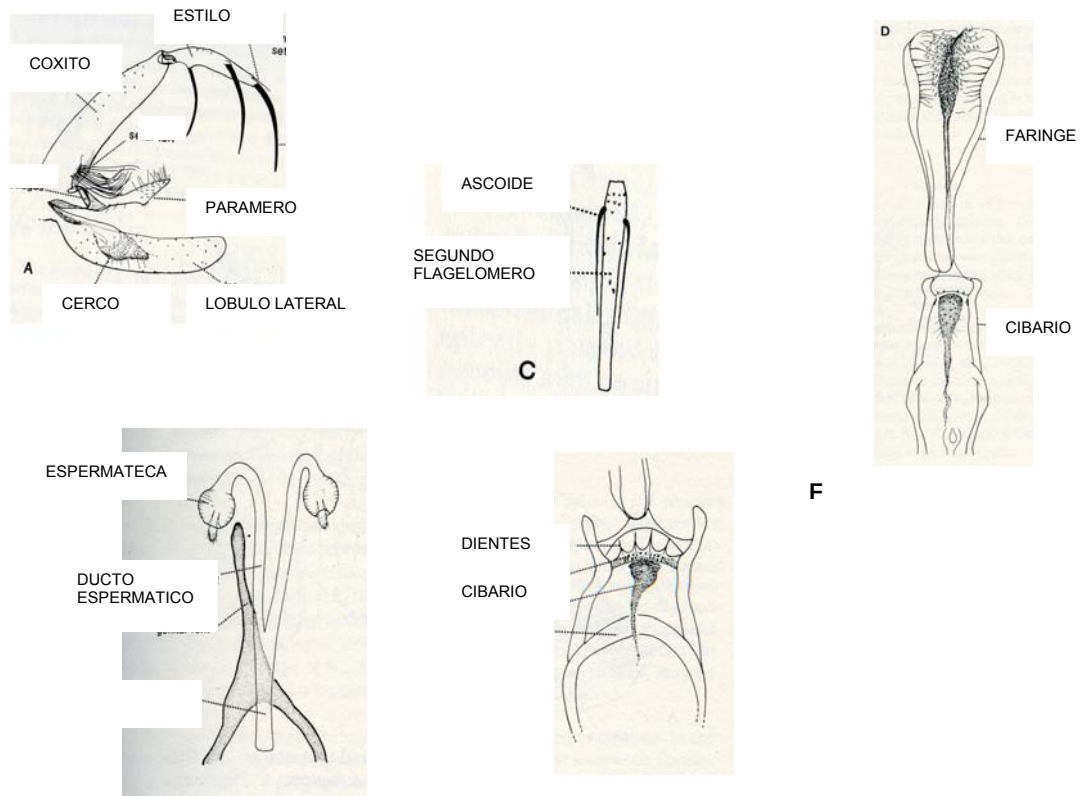


Figura.4a, c, d, e, f. Terminología de las estructuras de valor taxonómico para la identificación de los flebotominos. A. vista lateral de la terminalia del macho. C. flagelómero 2 mostrado el par de ascoides. D. faringe y cibario de hembra. F. cibario de hembra. Modificado de Young y Duncan. (1994).

ANÁLISIS DE DATOS

La información recabada en los formatos de campo, se incluyó en una base de datos utilizando EXCEL, así como en Biótica 4.1. Para obtener los datos de la estructura de la población en términos de la abundancia y diversidad se utilizó la riqueza específica de Margalef (DMg), el índice de dominancia de

Simpson (λ) y el índice de heterogeneidad de Shannon-Wiener (H'). Para el análisis estadístico de la diferencia intra-mensual e intra-semanal se aplicó ANOVA a través del programa EXCEL. Se elaboraron gráficos de abundancia y riqueza por sitio de colecta por mes, se construyeron curvas de acumulación de especies (EstimateS, versión 7.5). Con el propósito de reducir la dimensionalidad de los datos obtenidos y encontrar un patrón de la estructura comunitaria de los flebotominos y su correlación con los parámetros ambientales, se corrieron análisis multivariados utilizando el programa PRIMER 6.0. Los datos de abundancia de ambas matrices (por sitio y por mes) se transformaron a raíz cuarta, para la matriz de similitud se utilizó el índice de Bray-Curtis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colección de Arañas e Insectos ECOSUR-Ch

En el área periurbana de Chetumal se colectaron en 12 sitios de captura (Apéndice 1, tabla 2), un total de 6,414 especímenes representados por 12 especies (tabla 3) y dentro de estas especies se incluye la presencia de *Lutzomyia cayenensis* como nuevo registro para Quintana Roo. El nivel de curación para el total de especímenes capturados fue de 7 de acuerdo a los criterios establecidos en el convenio de términos y referencia con la CONABIO.

Tabla 3. Especies de flebotominos presentes en el área periurbana de Chetumal de marzo 2005 a febrero 2006. Colección de referencia "Insectos y Arañas" ECOSUR-Ch.

FAMILIA	GENERO	ESPECIE	INFRAESPECIE	TOTAL
Psychodidae	Brumptomyia	galindoi		95
	Lutzomyia	cayennensis	masiasi	42
		cruciata		856
		dasymera		3
		deleoni		617

		longipalpis		6
		olmeca	olmeca	3952
		panamensis		7
		permira		16
		shannoni		746
	Lutzomyia (Grupo aragoi)	carpenteri		5
	Lutzomyia (Grupo verrucarum)	ovallesi		69
GRAN TOTAL				6414

Colección Entomológica Regional CER-UADY

Para la CER se computarizaron un total de 11,333 especímenes, los cuales están representados en 17 especies (tabla 4) capturadas en 22 localidades; siete localidades en Campeche, dos en Yucatán y trece en Quintana Roo (Apéndice 1, tabla 5). Se reporta por primera vez la presencia de *Lutzomyia steatopyga* para la Península de Yucatán, estos especímenes fueron recolectados en el área periurbana de Chetumal. El nivel de curación para el total de especímenes colectados es de 7 de acuerdo al criterio establecido de por la CONABIO en el anexo de términos y referencias del convenio. Para el análisis y discusión de resultados de la abundancia y riqueza de especies solo se consideraron los 5031 especímenes colectados en el área periurbana de Chetumal, debido a que con ellos se cubre el objetivo del estudio de caso de un área endémica en Quintana Roo. El resto de los especímenes colectados (6302) con anterioridad en Campeche, Yucatán y norte de Quintana Roo solo se ingresaron en la colección y en la respectiva base de datos en el programa BIOTICA 4.1.

Tabla 4. Especie de flebotominos presentes en la península de Yucatán de abril 1994 a febrero 2006. *ANP- diferentes sitios de colecta al área periurbana de Chetumal (6302 ejemplares). **AP-Ch Área periurbana de Chetumal (5031 ejemplares).

				ANP*	AP-Ch**
Familia	Género	Especie	Infraespecie	No. de individuos	No. de individuos
Psychodidae	Brumptomyia	galindoi		795	128
		hamata		117	1
	Lutzomyia	cayennensis		3	
		cruciata		1643	713
		deleoni		1218	448
		longipalpis		9	
		olmeca	olmeca	514	2621
		panamensis		607	
		permira		4	
		shannoni		568	1033
		undulata		5	
		ylephitor		24	2
	Lutzomyia (Grupo aragoi)	carpenteri		299	1
	Lutzomyia (Grupo oswaldoi)	trinidadensis		36	1
	Lutzomyia (Grupo verrucarum)	ovallesi		458	1
		serrana		2	
		steatopyga			82
TOTAL POR AREA				6302	5031
GRAN TOTAL				11333	

Curva de acumulación de especies

Los resultados de la curva de acumulación de especies nos indica que el esfuerzo de muestreo fue suficiente para obtener un inventario casi completo de las especies de flebotominos del área periurbana de Chetumal, los valores esperados con respecto a los teóricos nos indican que se obtuvo el 92% de las especies (figura 5).

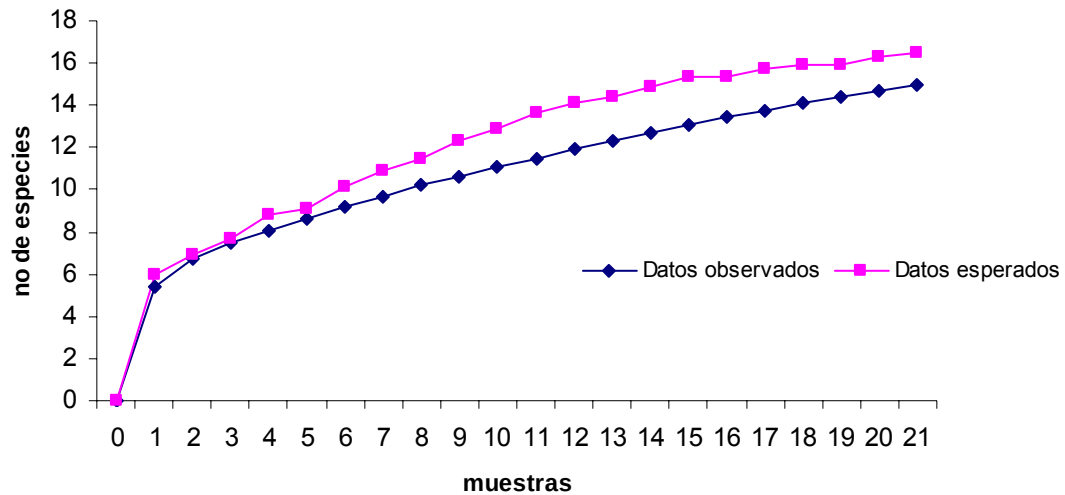


Figura 5. Número de especies observadas y estimadas para los flebotominos del área periurbana de Chetumal en los 19 sitios de colecta. Para el calculo de los datos observados se utilizó el algoritmo de Mao Tau, para los esperados se grafico el ACE (mean).

Se capturaron un total de 11,426 especímenes, representados en 15 especies y distribuidas en 19 localidades. El número de especies colectados en este estudio representan el 35% del total de la fauna de flebotominos reportada para México (Ibañez-Bernal, 2000). El 95.7% de la captura estuvo representado por *Lutzomyia olmeca olmeca* (57.5%), *Lutzomyia shannoni* (15.5%), *Lutzomyia cruciata* (13.5%), y *Lutzomyia deleoni* (9.2%) (Figura 6, Apéndice 1, tabla 6). Las especies con frecuencias relativas menores al 2% fueron *Brumptomyia hamata*, *Lutzomyia carpenteri*, *Lutzomyia trinidadensis*, *Lutzomyia dasymera* y *Lutzomyia longipalpis*. Con relación a la distribución espacial de la abundancia se observan diferencias importantes entre los sitios (figura 7). En general se registro que las estaciones de la zona norte tienden a ser más abundantes que los sitios de la zona sur; el 91.2% de la captura total se obtuvo en la sitios de la zona norte, dicha área estuvo conformada por 13 sitios y se caracteriza por la presencia de selva mediana subperennifolia relativamente bien conservada y bosque secundario de mas

de 18 años, es factible argumentar que el tipo de vegetación de esta zona esta favoreciendo la presencia de una mayor cantidad de especímenes que la zona sur, la cual se caracteriza por la presencia de bosque secundario de 10 a 15 años, la mayoría son sitios de inundación por su cercanía al río Hondo, en estos sitios la competencia con otros grupos de insectos como los mosquitos es importante ya que estos son abundantes en varias magnitudes mas que los flebotominos (observación directa de las muestras en cada sitio de colecta). Por otro lado los sitios de la zona norte con abundancias menores al 0.5% de la captura total se caracterizaron como sitios con impacto antropogénico; estos se ubican cerca de áreas deforestadas y de uso agrícola.

Con relación a la distribución de las especies por sitio, los resultados muestran que también existe una variación importante, algunas especies se distribuyen exclusivamente en uno y hasta tres sitios de colecta como es el caso de *Brumptomyia hamata*, *Lutzomyia carpenteri*, *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia trinidadensis*, *Lutzomyia cayennensis masiasi*, *Lutzomyia dasymera*, *Lutzomyia permira*, *Lutzomyia steatopyga* y *Lutzomyia ylpehitor*, quienes representan el 60% de la especies reportadas. Mientras que *Lutzomyia cruciata*, *Lutzomyia deleoni*, *Lutzomyia olmeca olmeca*, *Lutzomyia shannoni* y *Brumptomyia galindoi* se distribuyen en al menos 15 de los 19 sitios (Tabla 7).

Los pocos estudios realizados hasta el momento con relación al conocimiento de la fauna de flebotominos en la península de Yucatán, sugieren que las condiciones particulares del sitio de colecta determinan la presencia de especies que en su conjunto determinan la estructura comunitaria, siendo así, la presencia de las especies vectores o potenciales vectores estaría determinada por el microambiente de cada sitio de colecta. Para áreas endémicas de leishmaniasis en el estado de Campeche Tun (2004), reporta que *Lutzomyia panamensis* (38.22%) y *Lutzomyia ovallesi*, (11.4%) fueron las especies antropofílicas mas abundantes para la comunidad de Dos Naciones (municipio de Calakmul) mientras que para el

ejido La Guadalupe lo fueron *Lutzomyia cruciata* (47.8%) y *Lutzomyia olmeca olmeca* (20%). Navarro (1995) reporta para el ejido la Libertad como especies antropofílicas mas abundantes a *Lutzomyia olmeca olmeca* (22.4%), *Lutzomyia cruciata* (19.2%), *Lutzomyia ovallesi* (14.5%), y *Lutzomyia carpenteri* (10%). En este estudio encontramos que *Lutzomyia olmeca olmeca* fue la especie mas abundante y dominante para el área periurbana de Chetumal con un porcentaje (57.5%) alto comparado con el reportado por Navarro,1995 (22.4%) y con los porcentaje reportados en las colectas realizadas por Rebollar y col., (1994, 1995, 2001-2005, datos computarizados en BIOTICA 4.1) en diferentes sitios en Campeche y Quintana Roo, por ejemplo para Dzibalche, ejido Dos Naciones, ejido La Guadalupe, ejido La Libertad y el ejido Veinte de Noviembre se reporta para esta especie una abundancia relativa de entre el 11 y 16% (Apéndice 1 tabla 8). Los resultados de este estudio permiten suponer que el tipo de vegetación y fauna así como el microambiente del área periurbana de Chetumal favorecen la presencia de esta especie resultando un riesgo potencial de contagio de leishmaniasis a la población urbana y periurbana de la ciudad.

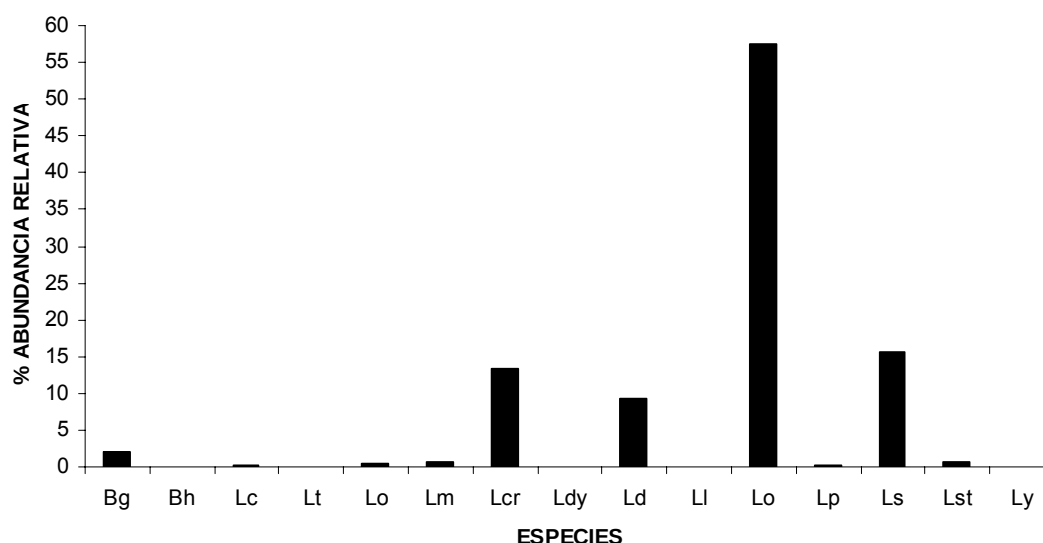


Figura 6. Abundancia relativa(%) por especie de flebotominos recolectados en el area periurbana de Chetumal de marzo 2005-febrero 2006. Bg-*Brumptomyia galindoi*, Bh- *Brumtomyia hamata*, Lc-*Lutzomyia carpenteri*, Lt- *L. trinidadenesis*, Lo- *L. ovallesi*, Lm- *L. cayenensis masiasi*, Lcr- *L. cruciata*, Ldy- *L. dasymera*, Ld- *L. deleoni*, Ll- *L. longipalpis*, Lo- *L. olmeca olmeca*, Lp- *L. permira*, Ls- *L. shannoni*, Lst- *L. stetopyga*, L.- *L. ylephitor*.

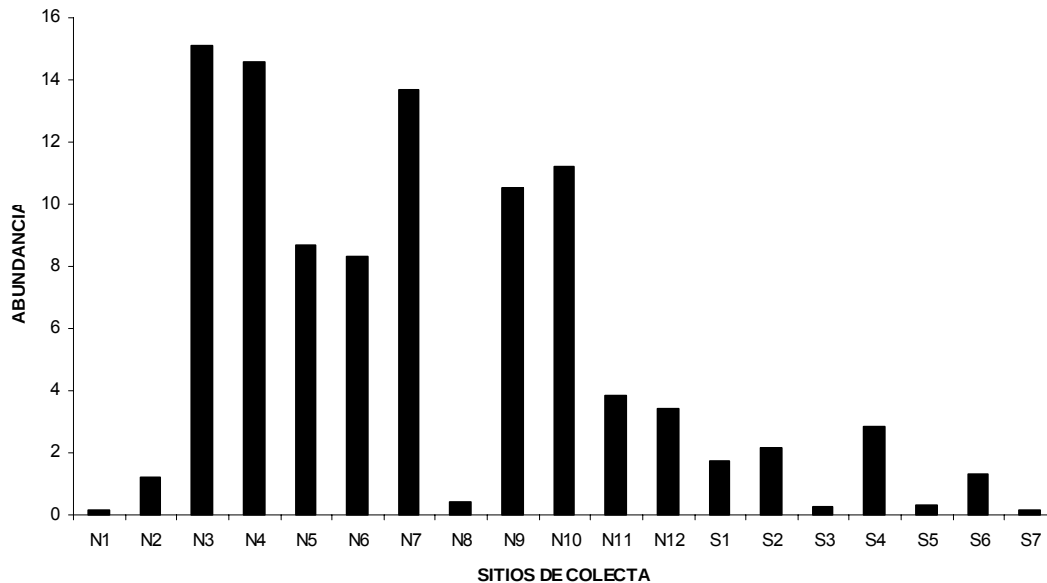


Figura 7. Abundancia relativa(%) de las especies de flebotominos recolectados en 19 sitios del área periurbana de Chetumal de febrero 2005-febrero 2006. N1 Alrededores de Chetumal, basurero municipal; Sitio 1, N2 Alrededores de Chetumal, basurero municipal; Sitio 2, N3 Chetumal, Rancho de Don Ambrosio, a 3.8 km de la colonia Nuevo Progreso, N4 Ejido Calderas, 5 km al Oeste del basurero municipal, N5 Ejido Calderas, a 5 km de la colonia Nuevo Progreso, N6 Ejido Santa Elena; Rancho La Esperanza, cultivo de vainilla, N7 A 4.3 Km de la Colonia Nuevo Progreso atrás de la Sabana, Chetumal, N8 Alrededores de Chetumal, basurero municipal, sitio 3, N9 Rancho "El Muyo"; 3 km al noroeste del basurero municipal, ejido Calderitas, N10 Rancho "El Muyo 2"; 1.4 km al noroeste del basurero municipal, ejido Calderitas, N11 Rancho "El Pino"; km 9 carretera Chetumal-Laguna Guerrero, N12 Rancho Teresita; 7 km al noroeste del monumento al Mestizaje, carretera Chetumal-Bacalar. S1 Carretera Chetumal-Bacalar km 4; detrás del convento de las monjas Clarisas, S2 Carretera Chetumal-Bacalar km 5; Predio del Doctor Rosas, frente a la gasolinera, S3 Chetumal, atrás del Aeropuerto, S4 Chetumal, Rancho Los Mangos; a 5 km del aeropuerto, S5 Chetumal Rancho Mauro Rosas; km 5 carretera Chetumal-Bacalar, S6 Chetumal, Rancho Los Mangos; a 3 km del aeropuerto, S7 Convento de las monjas Clarisas, carretera Chetumal-Bacalar km 4

Tabla 7. Ausencia-Presencia de las especies de flebotominos en los 19 sitios de colecta del área periurbana de Chetumal. a) N1- Alrededores del basurero municipal; N1 Alrededores de Chetumal, basurero municipal; Sitio 1, N2 Alrededores de Chetumal, basurero municipal; Sitio 2, N3 Chetumal, Rancho de Don Ambrosio, a 3.8 km de la colonia Nuevo Progreso, N4 Ejido Calderas, 5 km al Oeste del basurero municipal, N5 Ejido Calderas, a 5 km de la colonia Nuevo Progreso, N6 Ejido Santa Elena; Rancho La Esperanza, cultivo de vainilla, N7 A 4.3 Km de la Colonia Nuevo Progreso atrás de la Sabana, Chetumal, N8 Alrededores de Chetumal, basurero municipal, sitio 3, N9 Rancho "El Muyo"; 3 km al noroeste del basurero municipal, ejido Calderitas, N10 Rancho "El Muyo 2"; 1.4 km al noroeste del basurero municipal, ejido Calderitas, N11 Rancho "El Pino"; km 9 carretera Chetumal-Laguna Guerrero, N12 Rancho Teresita; 7 km al noroeste del monumento al Mestizaje, carretera Chetumal-Bacalar. S1 Carretera Chetumal-Bacalar km 4; detrás del convento de las monjas Clarisas, S2 Carretera Chetumal-Bacalar km 5; Predio del Doctor Rosas, frente a la gasolinera, S3 Chetumal, atrás del Aeropuerto, S4 Chetumal, Rancho Los Mangos; a 5 km del aeropuerto, S5 Chetumal Rancho Mauro Rosas; km 5 carretera Chetumal-Bacalar, S6 Chetumal, Rancho Los Mangos; a 3 km del aeropuerto, S7 Convento de las monjas Clarisas, carretera Chetumal-Bacalar km 4

a)

SITIOS DE COLECTA ZONA NORTE	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	N12
ESPECIE												
Brumptomyia galindoi	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X
Brumptomyia hamata												X
Lutzomyia carpenteri				X								X
Lutzomyia ovallesi		X	X	X	X	X		X				
Lutzomyia cruciata	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Lutzomyia deleoni	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Lutzomyia olmeca olmeca	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
Lutzomyia shannoni	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
Lutzomyia steatopyga										X	X	
NO TOTAL DE ESPECIES	4	6	6	7	6	6	4	3	5	6	6	7

b)

SITIOS DE COLECTA ZONA SUR	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
ESPECIE							
Brumptomyia galindoi	X	X	X	X			
Lutzomyia trinidadensis				X			
Lutzomyia ovallesi	X		X				
Lutzomyia cayennensis masiasi		X		X			
Lutzomyia cruciata	X	X	X	X	X	X	X
Lutzomyia dasymera		X					
Lutzomyia deleoni	X	X	X	X	X	X	X
Lutzomyia longipalpis		X		X			
Lutzomyia olmeca olmeca	X	X	X	X	X	X	X
Lutzomyia permira		X		X			
Lutzomyia shannoni	X	X	X	X	X		
Lutzomyia ylephiletor					X		
TOTAL DE ESPECIES	6	9	6	9	5	3	3

Distribución mensual de la abundancia

Los resultados obtenidos con relación a la distribución mensual de la abundancia de flebotominos reportan un incremento importante de noviembre 2005 a febrero 2006 (figura 8a, b, c). En Campeche también se observó que los picos de abundancia de estos insectos se registraba durante los meses mas fríos (noviembre a febrero) (Rebollar-Téllez y col., 1996a, 1996b). También se registro un pico en la abundancia de *Lutzomyia olmeca olmeca* durante los meses de julio y agosto 2005, las colectas realizadas durante estos meses representó el 23.5% del total para este especie (el 74.6% restante se recolectó de noviembre 2005 a febrero 2006) estos resultados sugieren que quizás estos meses también pueden ser importantes para el ciclo de transmisión de la leishmaniasis en el área periurbana de Chetumal, considerando a los sitios de colecta N3 y N7 (figura 1) como potenciales focos de infección. *Lutzomyia olmeca olmeca* fue incriminada por Biagi y col., 1965 como el vector de esta enfermedad así mismo los resultados del índice de infección apoyan esta evidencia al encontrar que el 4.7% de los especímenes colectados durante estos meses fueron positivos a *Leishmania* spp. Finalmente se considera que los picos de abundancia para esta especie en el área periurbana de Chetumal, en parte están determinados por el ciclo reproductivo y como ya se mencionó por las características del sitio de colecta (microhábitat) más que por la baja temperatura (Rebollar-Téllez y col., 1996a, 1996b).

Con relación a la distribución mensual de la abundancia por especie, se encontraron que los picos de las especies antropofílicas como *Lutzomyia olmeca olmeca* presentó tres picos de abundancia, uno en el mes de julio otro en noviembre y el último en enero de 2006, mientras que *Lutzomyia shannoni* y *Lutzomyia cruciata* presentaron solo un pico de abundancia, en noviembre la primera y en febrero de 2006 la última. (Figura 8 a, b, c).

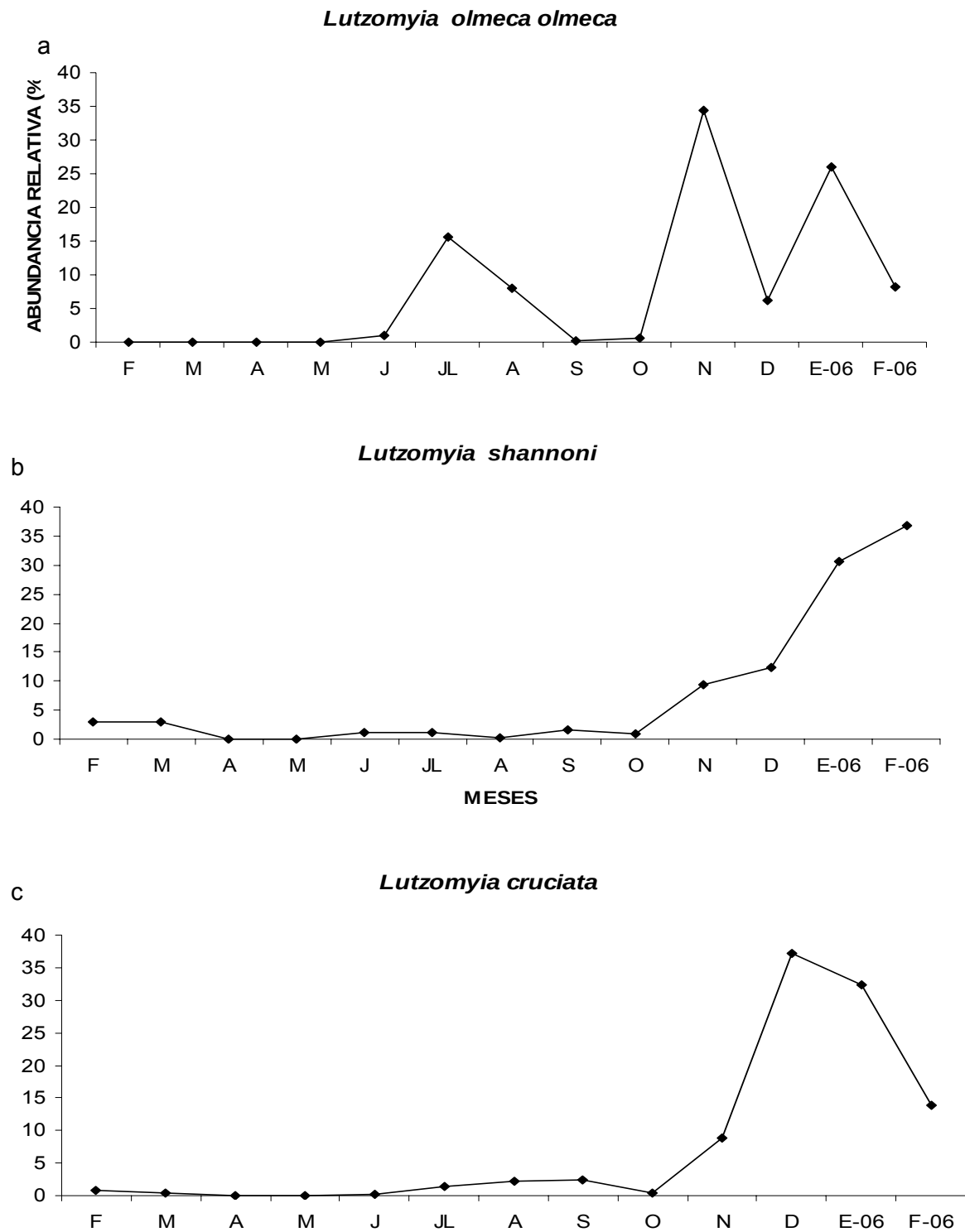


Figura 8a b, c. Distribución mensual de la abundancia para las especies antropofílicas de flebotominos mas abundantes del área periurbana de Chetumal.

Métodos de colecta

Los resultados relacionados con el método de colecta y el éxito de captura indican que el método mas eficiente fue la trampa Shannon y la Disney con el 43.9% y 41% de la captura total respectivamente. En cuanto a la selectividad de las trampas, los resultados muestran que *Lutzomyia deleoni* (80.9%), *Lutzomyia ovallesi* (85.7%), *Lutzomyia steatopyga* (100%) tuvieron preferencia por la trampa de luz CDC. La trampa Disney fue altamente selectiva en la captura de *Lutzomyia olmeca olmeca* (70.4%), sugiriendo una preferencia de esta especie por la alimentación de sangre de roedores (rodentofilia), mientras la trampa Shannon fue eficiente en la captura de las especies antropofílicas *Lutzomyia shannoni* (92.9%), *Lutzomyia cruciata* (90.5%), *Lutzomyia cayenensis masiasi* (73.8%) y fue altamente selectiva también para la captura de *Brumptomyia hamata*, *Lutzomyia trinidadensis*, *Lutzomyia carpenteri*, *Lutzomyia dasymera* y *Lutzomyia longipalpis* (Tabla 8). Los resultados encontrados nos indica que cada trampa es eficiente y selectiva para la captura de un determinado tipo de especie (Tun, 2004, Rebollar-Téllez y col., 2005) por tanto es importante definir *a priori* el tipo de especie que se requiere capturar así como la realización de un estudio de línea base para tener idea de la riqueza de especies en el área de interés. La sugerencia anterior surge del hecho que aunque las especies antropofílicas con las mayores abundancias fueron capturadas en la trampa Shannon, en este caso la trampa Disney jugo un mejor papel en cuanto a la captura del vector que potencialmente es responsable de la leishmaniasis en la zona de periurbana, *Lutzomyia olmeca olmeca*, la cual en este estudio representó la especie más abundante; tuvo una captura total en la trampa Shannon del 24.3% del 70.4% con la Disney, además todos los especímenes positivos de esta especie a *Leishmania spp.* fueron capturados con esta última trampa.

Tabla 8. Capturas totales por especie y abundancia relativa (A-R%) de flebotominos de acuerdo al tipo de trampa, CDC (Trampa de Luz CDC), Disney (Trampa Disney), Shannon (Trampa Shannon).

ESPECIE	CDC	A-R (%)	DIS	A-R (%)	SH	A-R (%)	TOTAL
<i>Brumptomyia galindoi</i>	114	51.12	3	1.35	106	47.53	223
<i>Brumptomyia hamata</i>					1	100	1
<i>Lutzomyia carpenteri</i>	5	83.3			1	16.6	6
<i>Lutzomyia trinidadensis</i>					1	100	1
<i>Lutzomyia ovallesi</i>	60	85.71	1	1.43	9	12.86	70
<i>Lutzomyia masiasi</i>	11	26.19			31	73.81	42
<i>Lutzomyia cruciata</i>	124	7.91	21	1.34	1421	90.74	1566
<i>Lutzomyia deleoni</i>	855	80.97	16	1.52	185	17.52	1056
<i>Lutzomyia dasymera</i>					3	100	3
<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	340	5.17	4633	70.49	1600	24.34	6573
<i>Lutzomyia longipalpis</i>					6	100	6
<i>Lutzomyia shannoni</i>	113	6.35	17	0.96	1649	92.69	1779
<i>Lutzomyia permira</i>	9	56.25			7	43.75	16
<i>Lutzomyia steatopyga</i>	82	100					82
<i>Lutzomyia ylephitor</i>	1	50			1	50	2
GRAN TOTAL							11426

Actividad horaria de los flebotominos en la trampa Shannon

El registro de las diferentes especies capturadas cada hora en la trampa Shannon resulta importante por ser la trampa de mayor riqueza de especies colectadas así como la trampa más eficiente en la colecta de especímenes con hábitos antropofílicos. A continuación se describen el comportamiento de las especies capturada entre las 18:00 a las 22:00. Los resultados que se presentan corresponden a la media geométrica de cada especie en las dos trampas Shannon utilizadas (Figura 9a, b, c; Tabla 9). El horario de colecta fue propuesto por el Dr. Rebollar-Téllez quien estableció en un ciclo de 24 hrs. que el horario de máxima captura es de las 18:00a las 22:00 hrs.

Lutzomyia shannoni. El 68.7% de la captura se obtuvo entre las 18:00 y 19:59 hrs.

Lutzomyia olmeca olmeca, se observa que la captura se sostiene de las 18:00 y 19:59 hrs.

Lutzomyia cruciata. El 70% de las capturas se registraron entre las 18:00 y las 19:59 hrs.

Lutzomyia longipalpis. El 100% de la captura se obtuvo entre las 20:00 y 20:59 hrs.

Lutzomyia deleoni. Las mayores capturas se registran entre las 18:00 y 19:59 hrs. y de las 20:59 a las 22:00.

Lutzomyia cayennensis masiasi. El 93.5% de la captura se obtuvo entre las 21:00 y las 21:59 hrs.

Lutzomyia permira. El 85% de la captura se obtuvo entre las 20:00-20:59 y las 21:00 y 21:59 hrs.

Lutzomyia dasymera. El total de la captura se obtuvo a las 20:00 hrs.

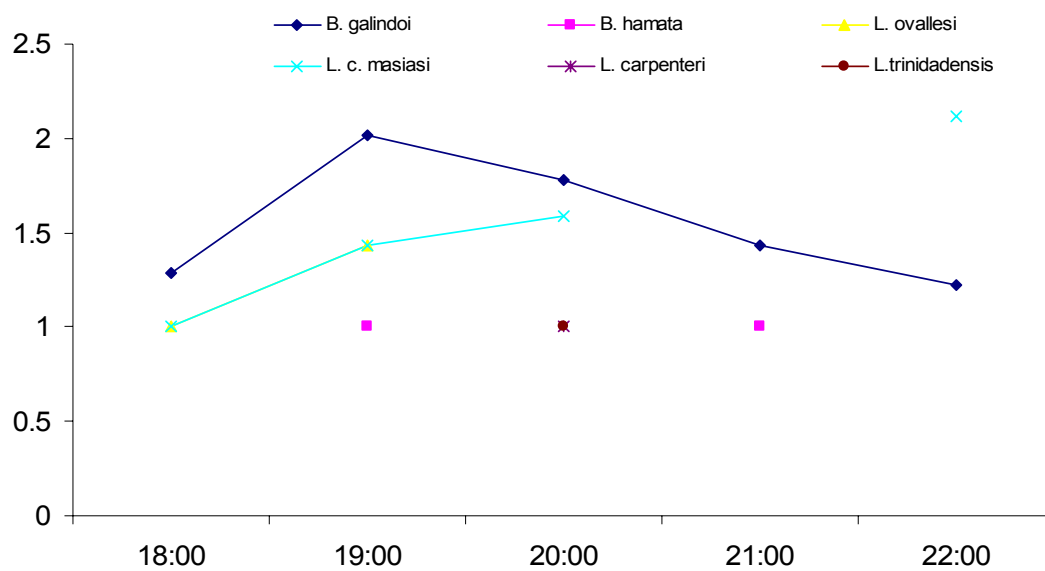
Brumptomyia hamata, se capturaron dos especímenes a las 19:00 y 21:00 hrs.

Lutzomyia ylephiletor. Solo se capturaron a las 19:00 hrs.

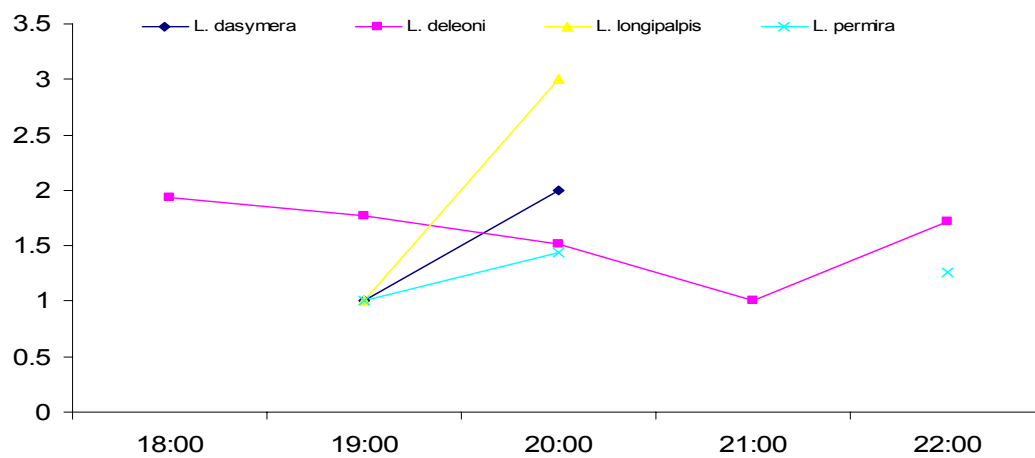
Lutzomyia trinidadensis. Solo se capturaron a las 20:00 hrs.

En general se observa que para las especies antropofílicas con las mayores abundancias; *Lutzomyia olmeca olmeca*, *Lutzomyia shannoni*, *Lutzomyia cruciata*, las mayores capturas se obtienen entre las 18:00 y las 19:59 hrs. Para las especies con bajas capturas observamos que la mayor abundancia fue entre las 19:00 y 21:00. La actividad hematofágica de los flebotominos en la región de Calakmul, Campeche (Dos Naciones, La Guadalupe) y en La Libertad (en el municipio de Escárcega) se registra para los mismos horarios que los reportados en este trabajo (18:00 a las 20:00 hrs.), de igual manera el mayor porcentaje de captura de hembras se reporta en las primeras horas de la noche (de 18:00 a las 19:59 hrs.) (Figura 10).

a



b



c

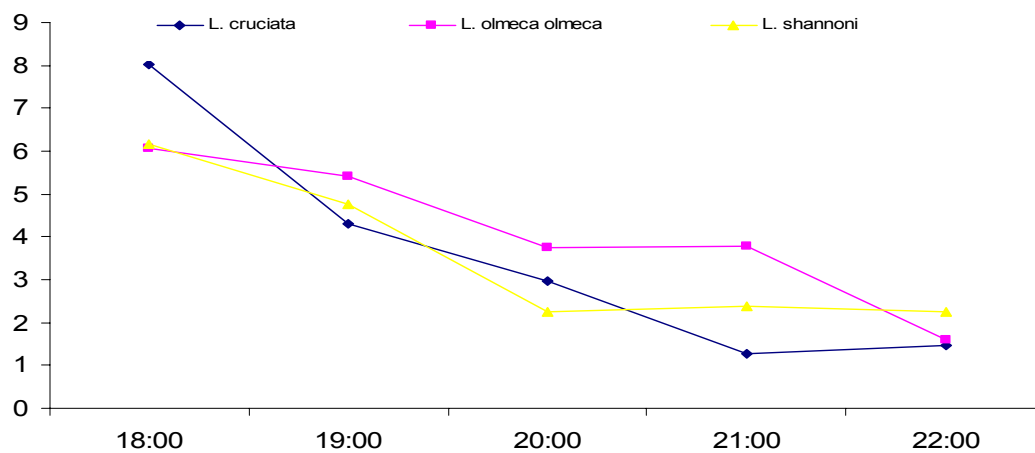


Tabla 9. Media geométrica de la abundancia de las especies de flebotominos capturadas en la trampa Shannon de las 18:00 a las 22:00 en los 19 sitios de colecta del área periurbana de Chetumal. La sombra en amarillo indica los valores maximos de captura para cada especie

ESPECIE	18:00	19:00	20:00	21:00	22:00
Brumptomyia galindoi	1.3	2.0	1.8	1.4	1.2
Brumptomyia hamata		1		1	
Lutzomyia ovallesi	1	7			
Lutzomyia masiasi	1	1.4	1.6		2.1
Lutzomyia carpenteri			1		
Lutzomyia trinidadensis			1		
Lutzomyia cruciata	8.0	4.3	3.0	1.3	1.5
Lutzomyia dasymera		1	2		
Lutzomyia deleoni	1.9	1.8	1.5	1	1.7
Lutzomyia longipalpis		1	3		
Lutzomyia olmeca olmeca	6.1	5.4	3.8	3.8	1.6
Lutzomyia permira		1	1.4		1.3
Lutzomyia shannoni	6.2	4.8	2.2	2.4	2.3
Lutzomyia ylephitor		1			

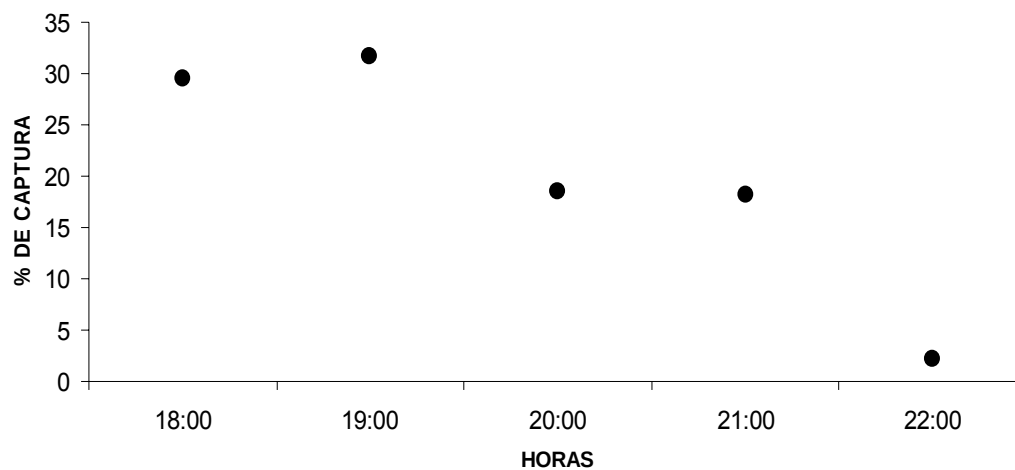


Figura 10. Porcentaje de captura de hembras de flebotominos capturados en la trampa Shannon de las 18:00 a las 22:00 hrs durante el periodo marzo 2005- febrero 2006.

Parámetros de la comunidad de flebotominos del área periurbana de Chetumal

El término comunidad, en este caso de los flebotominos, define a un conjunto de varias especies que interactúan o viven en un espacio y tiempo específicos. Sin embargo aunque este término ha sido valido en cuanto a su uso para determinar parámetros como la diversidad, riqueza específica y dominancia, las condiciones particulares de cada comunidad y la dependencia de estos índices en cuanto al tamaño de muestra no hace posible una comparación directa con otros sitios de colecta de la península de Yucatán, de tal modo que la discusión con base en los parámetros de la comunidad se hará únicamente entre los sitios muestreados de la zona periurbana de Chetumal, ya que se utilizaron los mismos métodos de colecta así como la misma intensidad de muestreo.

Se ha reportado que existen variaciones espaciales en la abundancia y riqueza específica en las comunidades de flebotominos, en general se a encontrado mayor diversidad en comunidades selváticas que en aquellas con un cierto impacto antropogénico (margen o en ambientes circundantes como zonas de tala, limpiadas, poblada o áreas de cultivo). Así también se ha reportado una mayor riqueza específica en la zona selvática que en sitios con vegetación sujeta a la perturbación humana como la explotación comercial de madera (Gomes y Galati, 1977; Galati y col., 1996; Salomón y col., 2002, Salomón y col., 2003). Sin embargo se han encontrado excepciones a éste patrón, Burbano (1992) encontró valores de riqueza similares en sitios de selva y sitios con vegetación sujeta a la explotación comercial o bien impactado por el desmonte, y aun más encontró que había una mayor riqueza de especies en sitios al margen de la selva.

La caracterización de los sitios de muestreo dentro de la zona periurbana de Chetumal nos indica que esta zona esta compuesta por un mosaico de ambientes que incluye bosque secundario de 10 a 25 años, selva mediana subperinifolia relativamente bien conservada y áreas con impacto

antropogénico (principalmente desmonte de la selva para áreas de cultivo y explotación de madera), que están determinando la riqueza específica, diversidad y dominancia de la comunidad de flebotominos. Con relación a la riqueza específica por sitio se observa diferencias de hasta 6 especies de un sitio con respecto a otro, como por ejemplo el sitio S2 con nueve especies y los sitios N8, S6 y S7 con solo tres. En el resto de los sitios se reportan una riqueza de entre ocho y cuatro especies. De acuerdo con estos resultados no fue posible inferir algún gradiente o patrón que indique que sitios de colecta con selva mediana subperennifolia presenta los mayores valores de riqueza o viceversa que los sitios con mayor impacto antropogénico como el bosque secundario (de 10 a 15 años) presente los menores valores, sin embargo es posible inferir que la tasa de recambio entre los sitios de colecta (diversidad $\beta=1.67$) nos indica que existe un grado importante de intercambio entre las especies (o un valor alto de heterogeneidad) a lo largo del gradiente entre sitios de selva subperennifolia bien conservada y bosque secundario de 10 a 15 años.

Con relación a los resultados de diversidad (índice de Shannon H'), se observa que los sitios con los mayores valores pertenecen tanto a sitios de selva mediana subperennifolia relativamente bien conservada (N11), bosque secundario de 18-25 años y sitios de bosque secundario de 10-15 años cercanos al río Hondo considerados áreas de inundación (S2, S3). Sitios de bosque secundario de 18-25 años (N3 y N7) presentaron los menores valores diversidad, indicando la baja heterogeneidad en estos sitios debido a la fuertemente dominancia de *Lutzomyia olmeca olmeca*.

Los resultados de dominancia indican que hay una tendencia en la mayoría de los sitios de colecta a que el valor de λ incremente indicando que la diversidad es mas sensible a la abundancia que a la riqueza (Magurran, 1988). Con el propósito de ilustrar objetivamente la dominancia por sitio se utilizaron las curvas de k-dominancia acumuladas, los resultados indican que la dominancia en la comunidad de flebotominos del área periurbana de Chetumal es alta y esta representada por *Lutzomyia deleoni*, *Lutzomyia*

cruciata, *Lutzomyia olmeca olmeca* y *Lutzomyia shannoni* (Figura 11a, b, Tabla 10).

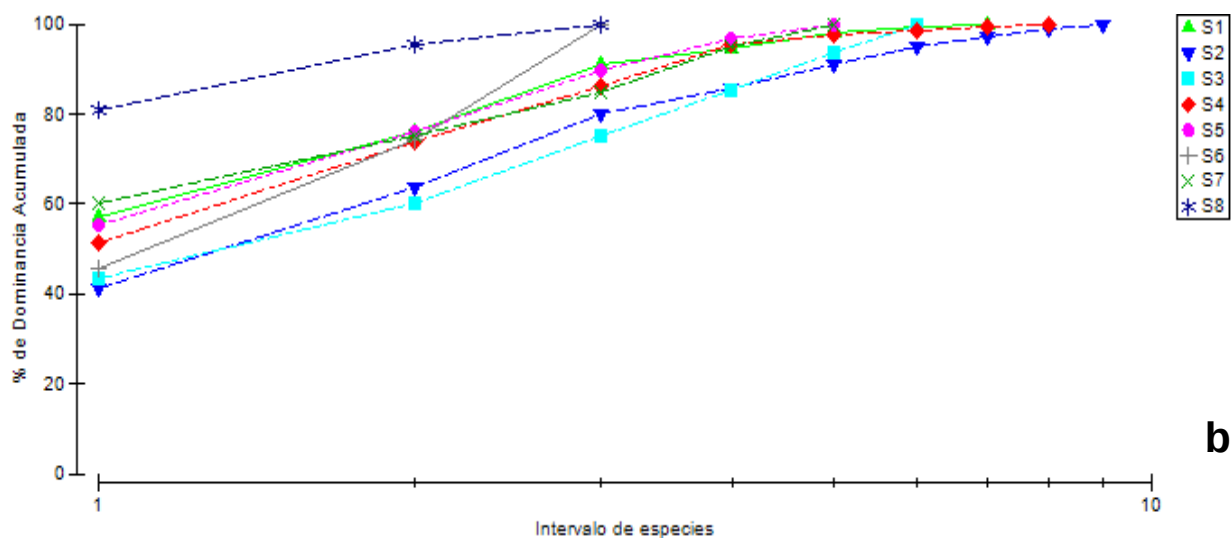
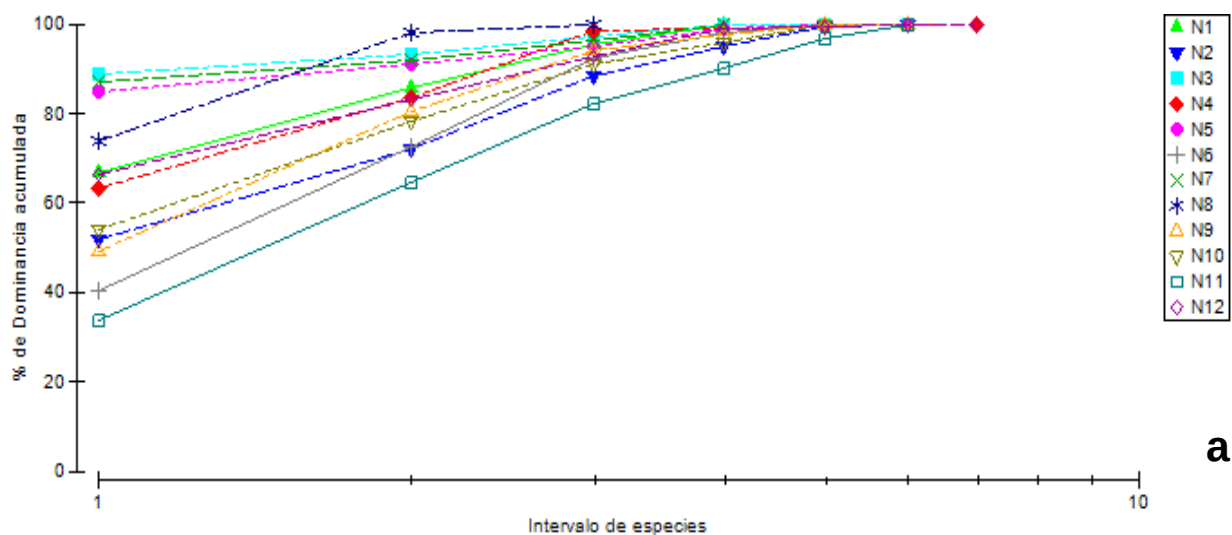


Figura 11a, b. Curvas de dominancia acumulada para las estaciones de la zona norte. b), curvas de dominancia acumulada para la zona sur del área periurbana de Chetumal durante el periodo marzo 2005-febrero 2006.

Tabla 10. Abundancia relativa (A-R%) y dominancia (1-Lambda') por sitio de las especies de flebotominos capturadas en el área periurbana de Chetumal (marzo 2005-febrero 2006).

ESPECIES	No. De sitios	A-R %	1-Lambda'
<i>Brumptomyia galindoi</i>	15	2.0	0.8
<i>Brumptomyia hamata</i>	2	0	1
<i>Lutzomyia carpenteri</i>	3	0.2	0.4
<i>Lutzomyia trinidadensis</i>	2	0.1	0.3
<i>Lutzomyia ovallesi</i>	6	0.4	0.8
<i>Lutzomyia masiasi</i>	3	0.6	0.5
<i>Lutzomyia cruciata</i>	19	13.5	0.9
<i>Lutzomyia dasymera</i>	1	0	0
<i>Lutzomyia deleoni</i>	20	9.2	0.9
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	2	0.1	0.3
<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	18	57.5	0.8
<i>Lutzomyia permira</i>	2	0.1	0.3
<i>Lutzomyia shannoni</i>	16	15.6	0.8
<i>Lutzomyia steatopyga</i>	2	0.7	0.1
<i>Lutzomyia ylephitor</i>	1	0	0

ANOVA

Se corrió una prueba de varianza de una sola vía con el propósito de determinar si existen diferencias entre los meses así como entre las semanas de cada mes de colecta, la razón de probar si existen estas diferencias se relacionado con el hecho de evidenciar que los picos de abundancia de los flebotominos en el área periurbana de Chetumal esta determinada para la mayoría de las especies por la temporalidad. Se trabajo bajo la hipótesis nula de: No existe diferencia significativa entre los valores de abundancia de cada mes de colecta (Tabla 11a). Los resultados indican que no fue posible rechazar la hipótesis nula, evidenciando que no es posible establecer diferencias entre los meses de colecta y la temporalidad, la razón de esto se

debe a la alta variabilidad observada entre los meses de colecta y los altos valores de la desviación estándar.

Por otra parte la importancia de probar que hay diferencias intra-semanales radicó en el hecho de que las colectas de cada día son muy variables en cuanto al número de especímenes colectados, de tal modo que era importante establecer el periodo mínimo de muestreo. Se trabajo con la hipótesis nula de no diferencias significativas entre los siete días de colecta de cada mes (Tabla 11b). De igual manera no fue posible rechazar la hipótesis nula por las mismas razones expuestas anteriormente. Sin embargo, en este trabajo se recomiendan la recolección durante 5 días consecutivos por mes.

Tabla 11. a). Resultados del ANOVA para la distribución de la abundancia por mes en el área periurbana de Chetumal. b) resultados del ANOVA para la distribución de la abundancia por semana en el área periurbana de Chetumal. Σ^2 = suma de cuadrados, gl = grados de libertad, X^2 = promedio de cuadrados, F = valor de F, P = probabilidad, F' = valor critico para F.

a

<i>Origen de las variaciones</i>	Σ^2	gl	X^2	F	P	F'
Entre grupos	865768.0615	12	72147.33846	1.32451108	0.20774198	1.805688778
Dentro de los grupos	9913707.6	182	54470.92088			
Total	10779475.66	194				

b

<i>Origen de las variaciones</i>	Σ^2	gl	X^2	F	P	F'
Entre grupos	558445.163	79	7068.926114	1.011584147	0.464027878	1.343570472
Dentro de los grupos	1488438.967	213	6987.976369			
Total	2046884.13	292				

Análisis Multivariado

Como método exploratorio se utilizó el Escalamiento Multidimensional MDS, para generar la matriz de similitud se utilizó el índice de Bray-Curtis, los datos fueron transformados a raíz cuarta; matriz abundancia por sitio y abundancia por mes) en ambas matrices se eliminaron las especies “raras”, es decir aquellas que se registraron en solo uno o hasta tres sitios de colecta y cuya contribución a la abundancia fue menor al 1%.

Para la matriz de abundancia los resultados nos muestran una separación de las estaciones pero sin flejar un gradiente. La agrupación de los sitios obedece a solo al arreglo con base a las diferencias en abundancia, las mayores abundancias corresponden a la zona norte y se asocian a vegetación de tipo selva mediana subperennifolia y bosque secundario de 18 a 25 años. Los sitios de abundancia intermedia se asocian a selva mediana subperennifolia, a sitios circundantes con disturbio antropogénico y bosque secundario de 10 a 15 años, mientras las abundancias bajas se presentan bosque secundario de 10-15 años y sitios circundantes a selva mediana subperennifolia con impacto antropogénico (Figura 12a). Por otro lado la distribución de la abundancia de *Lutzomyia deleoni* contribuye de manera importante en la ordenación de los sitios de colecta, esta especie se registro en todos los sitios con diferentes valores en su abundancia, esta distribución esta influenciada por el tipo de vegetación y microhábitat; se observa que las mayores abundancias para ésta especie fueron en sitios asociados a selva mediana subperennifolia, a sitios circundantes con disturbio antropogénico y bosque secundario de 10 a 15 años (Figura 12b). Así mismo la distribución de la abundancia de *Lutzomyia olmeca olmeca* también describe de manera el patrón de agrupación de las estaciones (Figura 12b). Permitiendo inferir que la distribución de *Lutzomyia olmeca olmeca* en la zona periurbana de Chetumal es preferentemente en sitios de de selva mediana subperennifolia y bosque secundario de 18 -25 años.

Con relación a que parámetros ambientales que explican de una mejor manera el patrón de distribución de la comunidad de flebotominos, los resultados indican que la velocidad del viento es el parámetro primario con una correlación de 0.566, como segunda mejor opción se tiene a la combinación de velocidad del viento y la humedad relativa (como parámetro secundario) con una correlación de 0.567 (Tabla 12).

El gráfico del escalamiento multidimensional de la matriz de abundancia por mes, muestra una agrupación con base a la temperatura mensual registrada (Figura 13a). La cercanía entre los meses mas fríos y los mas calurosos se debe principalmente a los picos de abundancia que se registraron en la zona periurbana para flebotominos incriminados como vectores (figura 13b), sugiriendo así que quizás los meses de mayor riesgo de contagio de la leishmaniasis fueron los meses de julio- agosto 2005, noviembre-diciembre 2005 y enero-febrero 2006. Los registros de abundancias intermedias se observaron durante los meses de junio y octubre 2005. Los menores valores se observaron durante el mes de marzo a mayo 2005. Cabe mencionar que las bajas abundancias registradas en febrero 2005 (durante el muestreo prospectivo) posiblemente se debieron a que hubo sequía en los dos años anterior al inicio del proyecto. Por otro lado las bajas abundancias registradas durante el mes de octubre 2005 se debieron posiblemente a la presencia del huracán Wilma; las salidas de campo se cancelaron en el tercer día de muestreo.

Las especies que contribuyen de manera importante en esta agrupación son *Lutzomyia cruciata* y *Lutzomyia olmeca olmeca* (Figura 13b).

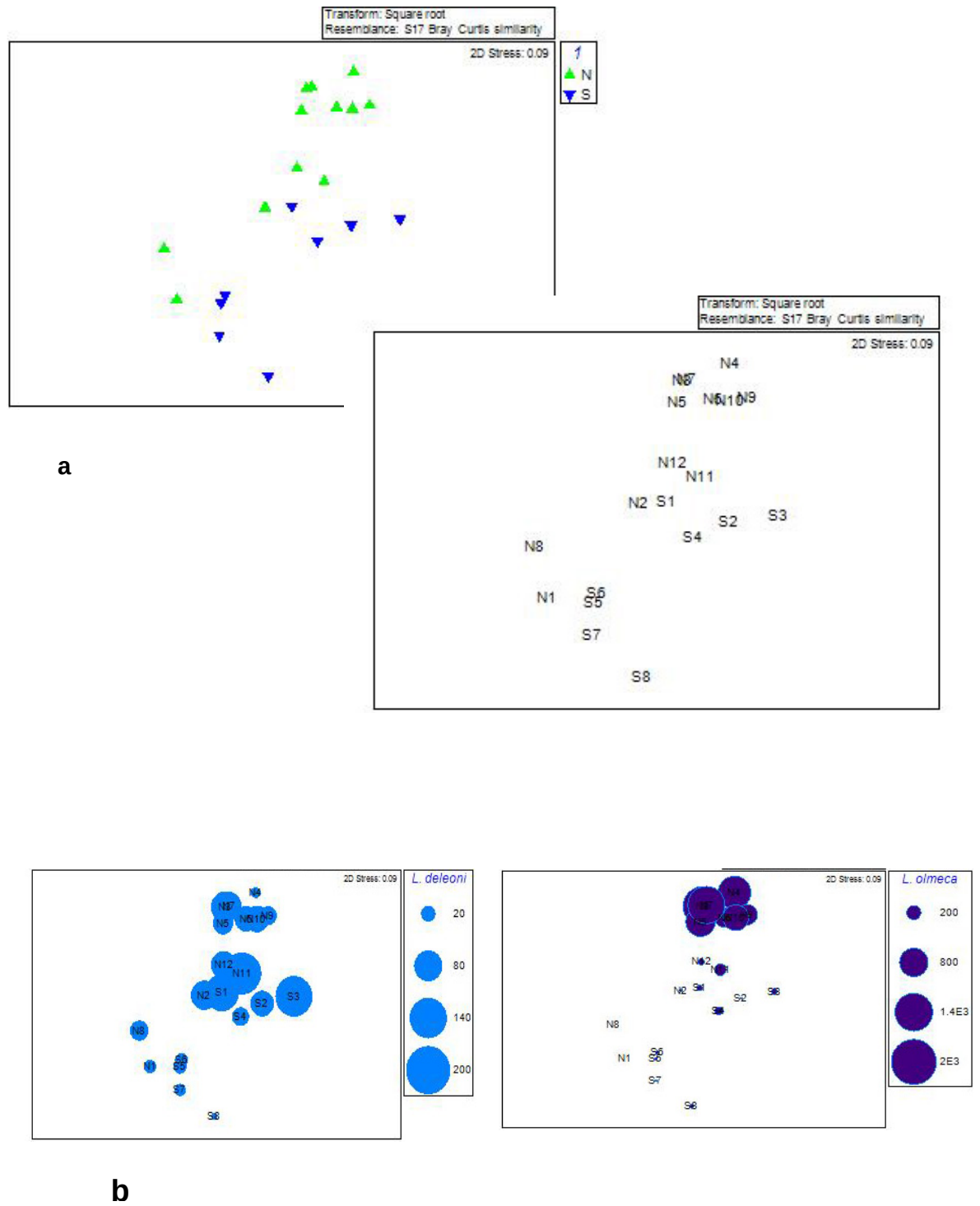
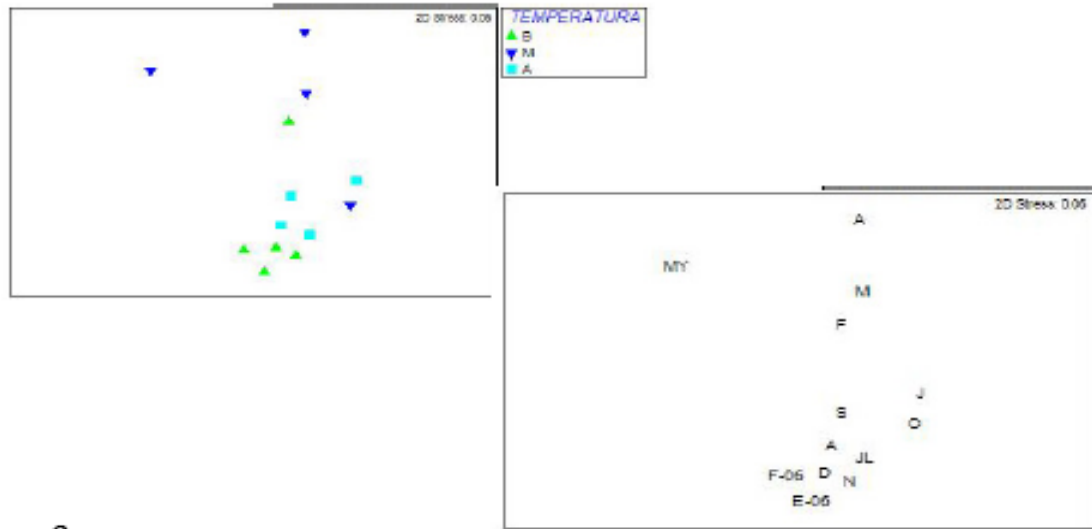
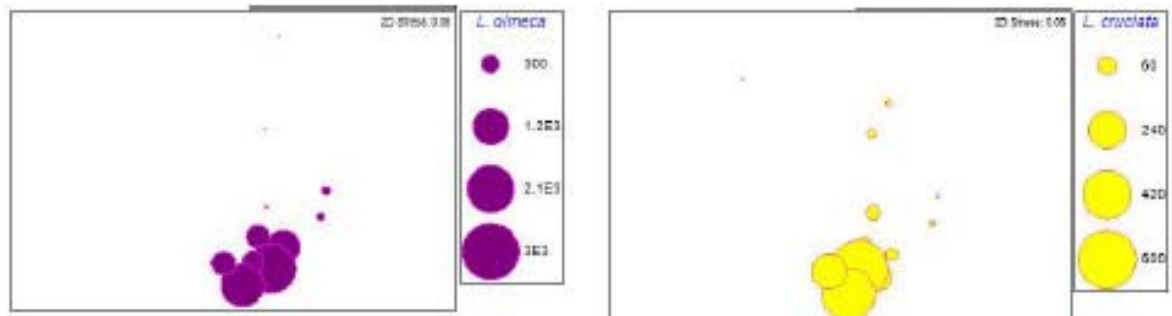


Figura 12. a) Ordenación MDS de los sitios de colecta con base a la abundancia, (stress 0.009, matriz de similitud con el índice Bray-Curtis). b) distribución de la abundancia de *Lutzomyia deleoni* y *Lutzomyia olmeca olmeca* de acuerdo al ordenamiento de los sitios de colecta.



a



b

Figura 13. a) Ordenación MDS de los sitios de colecta con base a la abundancia por mes de colecta (stress 0.009, matriz de similitud con el índice Bray-Curtis). b) distribución de la abundancia de *Lutzomyia cruciata* y *Lutzomyia olmeca olmeca* de acuerdo al ordenamiento de los sitios de colecta. Periodo 2005. F- febrero, M- marzo, A-Abril, MY-mayo, J-junio, JL- Julio, AG-agosto, S- septiembre, O-octubre, N- noviembre, D-diciembre. Periodo 2006 E-06- enero, F-06-febrero.

Tabla 12. Variables que mejor explican el patrón de distribución de la comunidad de flebotominos del área periurbana de Chetumal. Programa utilizado PRIMER 6.0. (T)- Temperatura, (HR)- Humedad relativa, (VV)- velocidad del viento.

Variables	1 (T)	2 (HR)	3 (VV)	
<i>Pruebas globales (Global Test)</i>	Sample statistic (Rho): 0.567	Significance level of sample statistic: 4%	Number of permutations: 99 (Random sample)	Number of permuted statistics greater than or equal to Rho: 3
<i>Mejores resultados (Best results) No.Vars Corr. Selections</i>	(2) 0.567 HR,VV	(1) 0.566 (VV)	(3) 0.543 T, HR, VVI	(2) 0.490 T,VV
	(2) 0.356 T,HR	(1) 0.318 HR	(1) 0.099 T	

Índice de infección de *Leishmania spp.* en la zona periurbana de Chetumal

El total de especímenes obtenidos para el análisis de infección, fue 1564 durante el periodo marzo 2005 a febrero 2006. Para la identificación del flebotomino y el parásito cada espécimen se disecó en tres partes; cabeza, tórax-abdomen y los 3 últimos segmentos del abdomen, destinando la cabeza y los 3 últimos segmentos abdominales para la identificación de la especie de flebotomino y el tórax-abdomen para la identificación del parásito; *Leishmania spp.* quien se desarrolla en el tracto digestivo e intestino del vector.

Con relación al diagnóstico de *Leishmania spp.* se reporta un índice de infección del 2%; 24 positivos de 1182 especímenes procesados (no fue posible procesar los 382 por falta de insumos). Las especies positivas a la presencia del parásito fueron *Lutzomyia olmeca olmeca*, *Lutzomyia cruciata* y *Lutzomyia shannoni*, estos especímenes fueron capturados en los meses de marzo, septiembre, agosto y diciembre 2005 (Tabla 13). Para la

identificación del género *Leishmania* se utilizó una región conservada del minicírculo del cinetoplasto, los oligos utilizados fueron LMC1-S y LMC1-R. Para la identificación de la especie se utilizó la región del ITS (espaciador transcrito interno) y la región final del 18S de los genes del ADN ribosomal con los oligos IR1 y LM17, estos oligos son específicos para *Leishmania (Leishmania) mexicana*, especie que se ha propuesto como dominante en el ciclo de transmisión de la leishmaniasis en la península de Yucatán.

Los resultado de este trabajo afirman la presencia del genero *Leishmania* en tres especies de flebotominos *Lutzomyia olmeca olmeca*, *Lutzomyia cruciata* y *Lutzomyia shannoni* (Figura 14), el papel de estas especies como vectores de *Leishmania* fue propuesto anteriormente por Biagi y col., 1965 y Navarro-Correa, 1995. Así mismo se confirma que la especie responsable de la leishmaniasis cutánea localizada en el área periurbana de Chetumal es *Leishmania (Leishmania) mexicana* (Figura 15). Conjuntamente se confirma la eficiencia de los oligos específicos utilizados para género y especie.

De acuerdo con estos resultados no fue posible establecer un periodo de infección para *Lutzomyia olmeca olmeca*, así como tampoco fue posible relacionar el índice de infección con el periodo de mayores capturas (noviembre y enero) ya que los especímenes positivos se encontraron en el mes de agosto. Lo que fue posible proponer que el sitio de colecta de este mes se considera un foco de infección dentro del área periurbana (sitios N3). También se consideran focos de infección los sitios N2, N6, N10 y N12 (Apéndice 1; tabla 2 y 5). Para *Lutzomyia cruciata* se observa que en el índice de infección se relaciona con los pico de abundancia en el mes de diciembre. Para *Lutzomyia shannoni* tampoco fue posible relacionar a los dos especímenes positivos con el pico de abundancia.

Respecto al valor del índice de infección reportado en este trabajo (1.9%), encontramos que el valor es similar al de áreas endémicas de leishmaniasis tanto en Latinoamérica como en medio oriente; 3.5% (Kato y col., 2005 para la región andina de Ecuador), 3.9% (Paiva y col., 2006 para áreas endémicas en Brasil), 9.1% (Córdoba-Lanus y col., 2006 provincias de Tucumán y Salta,

Argentina), 4.2% (Azizi y col., 2006 en Nourabad-Mamassani en el distrito de la provincia de Fars, Iran) y 0.68% (Guerbouj y col., 2006 en la región El Kef, norte de Túnez). Consideramos importante puntualizar que las condiciones propias del sitio; vegetación arbórea, presencia de roedores, madrigueras así como el ciclo de reproducción estarían influyendo de manera importante en el número de flebotominos infectados por sitio. Los resultados encontrados en este trabajo apoyan la idea que quizás la dinámica poblacional esta influyendo directamente en el índice de infección; el valor reportado aquí se considera que esta subestimado, esta aseveración se basa en las siguiente evidencia, durante el mes de agosto se logro identificar la presencia de *Leishmania* en al menos el 12% de la captura de *Lutzomyia olmeca olmeca*, sin embargo, para el mes de noviembre no fue posible identificar ningún espécimen positivo para esta especie en el mismo sitio de captura, una posible explicación para esto quizás sea la observación del Biol. May, todos los especímenes de esta captura presentaban el abdomen completamente retraído indicando un ayuno prolongado debido quizás a que se trataba de hembras jóvenes de primera alimentación, sin embargo para comprobar esto seria necesario realizar un estudio de estructura de edades.

Por otro lado los resultados de acuerdo con la secuencia conservada del gen del 18S rRNA indicaron que el método extracción fue exitoso (Figura 16).

Tabla 13. Relación de especies de flebotominos positivos a *Leishmania spp.*, método y fecha de colecta.

ID PCR	ESPECIE	FECHA	TIPO DE TRAMPA
07	<i>Lutzomyia shannoni</i>	Marzo 2005	SHANNON
09	<i>Lutzomyia shannoni</i>	Marzo 2005	SHANNON
575	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	julio 2005	DISNEY
578	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	Septiembre 2005	DISNEY
590	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	Agosto 2005	DISNEY
596	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	Agosto 2005	DISNEY
615	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	Agosto 2005	DISNEY
617	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	Agosto 2005	DISNEY
691	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	Agosto 2005	DISNEY

692	Lutzomyia olmeca olmeca	Agosto 2005	DISNEY
1015	Lutzomyia olmeca olmeca	Diciembre 2005	DISNEY
1017	Lutzomyia olmeca olmeca	Diciembre 2005	DISNEY
1028	Lutzomyia cruciata	Diciembre 2005	SHANNON
1036	Lutzomyia olmeca olmeca	Diciembre 2005	DISNEY
1040	Lutzomyia olmeca olmeca	Diciembre 2005	SHANNON
1046	Lutzomyia cruciata	Diciembre 2005	SHANNON
1053	Lutzomyia olmeca olmeca	Diciembre 2005	DISNEY
1056	Lutzomyia cruciata	Diciembre 2005	SHANNON
1059	Lutzomyia cruciata	Diciembre 2005	SHANNON
1061	Lutzomyia olmeca olmeca	Diciembre 2005	SHANNON
1073	Lutzomyia cruciata	Diciembre 2005	SHANNON
1089	Lutzomyia olmeca olmeca	Enero 2006	DISNEY
1167	Lutzomyia olmeca olmeca	Enero 2006	SHANNON
1079	Lutzomyia cruciata	Agosto 2005	SHANNON

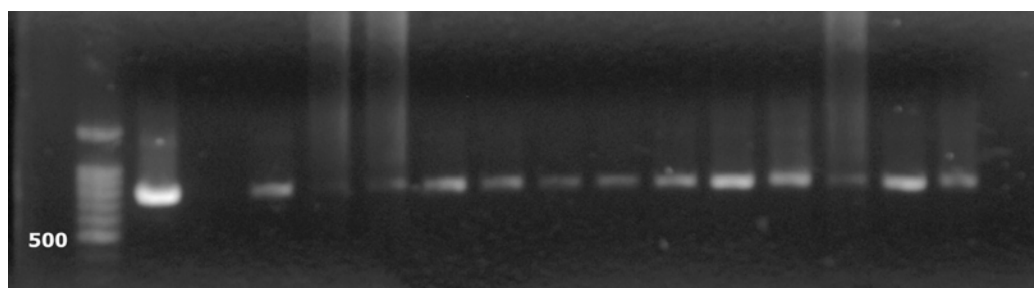


Figura 14. Amplificación del minicírculo del cinetoplasto con los iniciadores LMC-1R y LMC-1S para la identificación del género *Leishmania*. Línea 1, marcador de ADN (Promega), 2 control positivo MC (cepa .de *Leishmania (Leishmania) mexicana* donada por la Dra Berzunza UNAM) 3, control negativo del sistema, 4 (1015), 5 (1017), 6 1028, 7 (1036), 8 (1040), 9 (1056), 10 (1053), 11 (1046), 12 1059, 13 (1061), 14, 1089, 15 (1073), 16 (1079).

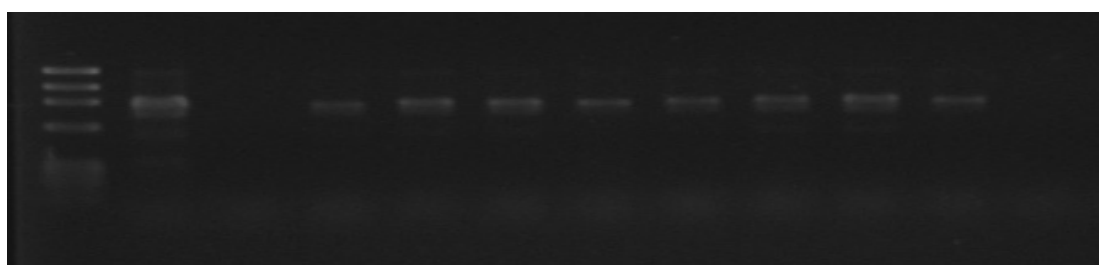


Figura 15. Treinta y cinco ciclos de amplificación con la PCR con la región del espaciador transcrito interno (ITS) y la región final del gen ribosomal 18S con los oligos específicos IR1 y LM17. Se utilizo el ADN de los flebotominos positivos; MW marcador, ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments INVITROGEN (línea 1), *Leishmania (Leishmania) mexicana* MC control positivo (línea 2), control negativo (línea 3), 1015 (línea 4), 1017 (línea 5), 1028 (línea 6), 1040 (línea &), 1059 (línea 8), 1061 (línea 9), 1073 (línea 10), 1089 (línea 11), 1179 (línea 12)*.

* flebotomo positivo a *Leishmania* pero que no amplifico para *Leishmania mexicana mexicana*.

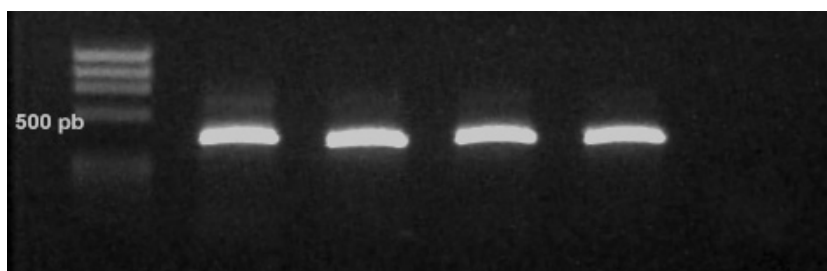


Figura 16. Treinta y cinco ciclos de amplificación con la PCR con la región conservada del gen ribosomal 18S rRNA con los oligos específicos Lu. 18S y Lu. 18R, banda de diagnóstico de 400pb. MW marcador, ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments INVITROGEN (línea 1), control positivo ADN de *Periplaneta americana* (cucaracha) (línea 2), *Lutzomyia olmeca olmeca* (línea 3, línea 4, línea 5).

CONCLUSIONES

La curva de acumulación de especies indica que se tienen 92% de las especies de flebotominos presentes en el área periurbana de Chetumal.

La abundancia y riqueza específica de flebotominos en el área periurbana de Chetumal muestran que las especies dominantes fueron *Lutzomyia olmeca olmeca*, *Lutzomyia shannoni*, *Lutzomyia cruciata* y *Lutzomyia deleoni*.

Las variaciones en la abundancia con respecto a la estacionalidad sugieren que los picos de abundancia de flebotominos se presentan en los meses de noviembre a febrero. Para la especie dominante *Lutzomyia olmeca olmeca* los picos de abundancia se extienden a julio-agosto.

El área periurbana de Chetumal se concibe como una serie de mosaicos con condiciones microambientales únicas que determinan la riqueza y abundancia del flebotominos en el sitio de colecta.

Los mayores valores de abundancia se encontraron en sitios de selva mediana subperennifolia y bosque secundario de 18 a 25 años.

Los mayores valores de riqueza específica se encontraron en sitios de bosque secundario de 10-15 años, áreas de impacto antropogénico y selva mediana subperennifolia bien conservada. .

Se propone a *Leishmania mexicana mexicana* como la especie potencialmente responsable de la LCL en la zona periurbana de Chetumal.

Se confirma el papel de *Lutzomyia olmeca olmeca* como vector en el ciclo de transmisión de la leishmaniasis y se propone que *Lutzomyia cruciata* y *Lutzomyia shannoni* pueden estar involucradas en la transmisión de esta enfermedad en el área periurbana de Chetumal.

La estructura comunitaria y la actividad de los flebotominos del área periurbana de Chetumal esta determinada por la velocidad del viento y la temperatura.

RECOMENDACIONES

Biología Molecular

Se recomienda el uso de los oligos LMC-1R y LMC-1S para la identificación de género *Leishmania* en los flebotominos, este set de oligos resultó ser el mas eficiente en la amplificación aun utilizando volúmenes de ADN de hasta 6 µl. El uso de los oligos IR1 y LM17 para la identificación de la especie de *Leishmania (Leishmania) mexicana*.

De los resultados obtenidos con el uso de diferentes enzimas y premezclados para la amplificación por PCR, se sugiere el uso de

premezclados 2X, este último especialmente para la identificación de las especies de *Leishmania* por secuenciación.

El método de extracción de ADN utilizado en este proyecto fue el de fenol/cloroformo recomendado por Kato y col., 2005, este autor recomendó el uso de un microlitro de ADN para la amplificación sin embargo en este trabajo se requirió de diez a nueve microlitros por muestra, por lo que se recomienda utilizar los premezclados de amplificación para PCR 2X, con los cuales debe ser posible obtener una banda de diagnóstico con 1µl del templado.

BIBLIOGRAFIA

Battacharyya, R., Dass, K., Sen., S., Roy, S., and Majumder, H.K. 1996. Development of a genus specific primer set for detection of *Leishmania* parasites by polymerase. *Microbiology Letters*. 135:195-200.

Berzunza-Cruz, M., Padilla, A., Pérez-Montfort, R. e Becker, I. Desarrollo de un diagnóstico por PCR que permite diferenciar entre especies del complejo *Leishmania (L.) mexicana* y *Leishmania (V.) braziliensis*. Enviado a la publicación técnica de la CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS. Brasilia, Brasil – 23 al 25 de noviembre de 2005

Biagi, F., Biagi, A.M., Beltran-H., F. 1965. *Phlebotomus flaviscutellatus* transmisor natural de la *Leishmania mexicana*. Prensa Médica, México. 30: 267-272.

De Bruijn, H. L., and Barker, D.C. 1992. Diagnosis New World *Leishmania braziliensis* complex and amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica*. 52:45-48.

De Bruijn, M.H. Labrada, L., Smyth L.A., Santrich, A.J.C. & Barker, D.C. (1993). A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. *Tropical Medicine and Parasitology*. 44:201-207

Burbano ME. (1992). Distribución vertical de los flebótomos *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en un foco de leishmaniasis cutánea. Colombia Med; 23:120-25

Cupolillo E, Grimaldi Jr GM, Momen H, Beverley SM (1995) Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 73:145-155.

Disney, R. H. L. 1968. Observations of zoonosis *Leishmaniasis* in British Honduras. *Journal Applied Ecology*. 5:1-59.

Eresh, S., McCallum, S.M., Barker, D.C. 1994. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology*. 109:423-433.

Galati, E.A.B., Nunes, V.L.B., Dorval., M.E.C., Oshiro, T., Cristaldo. M.A., Espindola, M.A., da Rocha, H.C., Garcia, W.B. 1996. Estudo flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) . Em área de leishmaniose tegumentar, no estado Mato Grosso do sul, Brasil. *Revisión Saude Publica*. 30:115-128.

Gomes, A.C. y Galati, E.A.B. 1977. Flebotominos de Londrina, Parana (Brasil) e observações ecológicas sobre algumas espécies. *Revisión Saude Publica*. 11:284-287.

Guevara, P., Alonos, G., da Silveira, F., de Mello., Scorza, J. V., Anez, N. 1992. Identification of New World *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. *Molecular Biochemical Parasitology*. 56:15-26.

Grimaldi, G., Jr and Tesh, R.B. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications of future research. *Clinical Microbiology Revision*. 6:230-250.

Ibáñez B.S. (2002). "*Phlebotominae* (Díptera; Psychodidae) de México III. Las especies de *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) Barietto, del grupo aragoí de *L.*

(*Trichopygemyia*) Barrietto, del grupo Dreisbachi y de *L. (Nyssomyia)* Barrietto". Folia Entomol, Mex. 41(2): 149-183.

Ibáñez B.I. (2005). "*Phlebotominae* (Díptera; Psychodidae) de México IV. Clave ilustrada para la identificación de las hembras de *Lutzomyia franca*. Folia Entomol, Mex. 44(2):

Kato, H., Uezato, H., Katakura, K., Calvopiña, M., Marco, J.D., Barroso, P.A., Gomez., E.A., Mimori, T., Korenaga, M., Iawata, H., Nonaka, S., Hashiguchi, Y. (2005). Detection and identification of *Leishmania* Species within Naturally Infected Sand Flies in the Andean Areas of Ecuador by a Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72(1): 87-93.

Lopez, M., Inga, R., Cangalaya, M., Echeverria, J., Llanos-Cuentas, A., Orrego, C. & Arevalo., J. 1993. Diagnosis of *Leishmania* using the polimerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49: 348-356.

Meredith, S. E., Zijlstra, E., Schoone, J.G., Kroon. C.C., van Eys, K.U., Schaeffer, A.M. and Lawyer, P.G. 1993. Development and application of polymerase chain reaction for detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. *Archives Institute Pasteur Tunis*, 10:419-431.

Mathis A., and Desplazes, P. 1995. PCR in vitro cultivation for detection of *Leishmania spp.* In diagnostic samples from humans and dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:1145-1149

Rebollar-Téllez, E. A., Andrade-Narvez, F.J., Fernandez-Salas, I., Villanueva-Reyes, F. 1996a. Collections of sand flies (Diptera: Psychodidae) from mammal burrows in an area of cutaneous leishmaniasis in Campeche, México. *Entomological News*. 107:317-321.

Rebollar-Téllez, E. A., Ramirez-Fraire, A., Andrade-Narvez, F.J. 1996 b. A two years study on vectores of cutaneous leishmaniasis. Evidence of sylvatic transmission cycle the state Campeche, México. *Memorias do Institute Oswaldo Cruz*. 91:555-560.

Reithinger R, Lambson B. E, Barker D. C, Davies C. R, 2000. Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. in dog blood and bone marrow. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 748–75.

Rodriguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Takif, H., Bloom, B.R. & Convit J., 1994. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:2246-2252.

Rodgers, M.R., S.J. Popper, and D.F. Wirth. 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 71:267-275.

Salomón, O.D.G., Rossi, G., Spinelli., G.R. 2002. Ecological aspects of Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of tegumentary leishmaniasis in Northeastern Argentina, 1993-1998. *Memorias do Institute Oswaldo Cruz*. 97:163-168.

Salomón, O.D.G., Rossi, G., Cousiño, B., Spinelli., G., Rojas de Arias, A., Lopez del Puerto., D.G., Ortiz, A.J. 2003. Phlebotomine Sand Flies in Paraguay. Abundance distribution in the Southeastern region. *Memorias do Institute Oswaldo Cruz*. 98:185-190.

Sudia, W.D., Chamberlain, R.W. 1962. Battery light trap an improved model. *Mosquito News*. 22:126-129.

Smyth, A.A., Ghosh, M.Q. Hassan, M.H. L. de Bruijn, S. Adhya, K.K. Mallik, and D.C. Barker. 1992. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of Kala-azar patient. *Parasitology* 105:183-192.

Tun, K.E. 2004. Diversidad, Abundancia de Flebotomos adultos (Diptera: Psychodidae) en dos localidades rurales del estado de Campeche, Mexico. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Autónoma de Yucatán. México.

Young, D. G. y M. A. Duncan. (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* Sand Flies in México, the West Indies, Central and south American (Diptera: Psychodidae). Associated Publishers. Am. Ent. Inst. EEUU. N°33.

Young, D. G. y P. V. Perkins. (1984). "Phlebotomine sand flies of North, America (Diptera: Psychodidae) Mosq". News 44: 263-304.

AGRADECIMIENTOS

A la CONABIO por el invaluable apoyo económico para realización de este proyecto.

Al Dr. Sergio Ibañez Bernal por su valiosa colaboración en la identificación y corroboración de los especímenes y por su generosidad al compartir con el grupo de trabajo su vasta experiencia en la identificación de flebotominos.

Al Dr. Eduardo Rebollar Téllez por su apoyo incondicional para la realización de este proyecto así como su paciencia para solventar los pequeños imprevistos en las salidas de campo.

A la Dra. Carmen Pozo de la Tijera por su tiempo y valiosa ayuda en la elaboración del informe final de este proyecto.

Al personal de la secretaria de salud del estado (M en C Marco Domínguez y Biol. Pedro Miss) por su apoyo y participación en la captura de flebotominos.

A la Bióloga Blanca Prado Cuellar por su invaluable ayuda en las correcciones y elaboración de la base de datos de flebotominos de la Península de Yucatán.

A Emigdio May por su disposición siempre a colaborar y trabajar aun en horas fuera de horario, sin su ayuda este proyecto no se hubiera podido completar con éxito.

A la Bióloga Noemi Salas Suárez por su apoyo en la computarización de los especímenes de flebotominos en la base de datos BIOTICA 4.1

Al Sr. Margarito Tuz por su ayuda en la caracterización de la vegetación arbórea de los sitios de muestreo.

Al resto de los participantes (Jesús Miss Domínguez, Manuel Toledo Hernández, Pablo Beutelspacher García) por su disposición y horas de desvelo durante las salidas de campo.