

# Identificación de hongos patógenos para *Lutzomyia* sp. (Diptera: Psychodidae) vectores de leishmoniosis

Identification of pathogenic fungi for *Lutzomyia* sp. (Diptera: Psychodidae) vectors of Leishmaniasis

Luis Fernando Vallejo<sup>1</sup>  
Sandra Uribe Soto<sup>1</sup>  
Iván Darío Vélez Bernal<sup>2</sup>

## Resumen

El objetivo de este estudio fue identificar hongos patógenos de *Lutzomyia* spp., tanto para estados inmaduros como adultos capturados en el campo; para ello se realizaron aislamientos directos sobre larvas y adultos infectados y cultivo de los aislamientos para su posterior identificación. *Conidiobolus coronatus*, *Fusarium oxysporum* y *Paecilomyces* sp. se asociaron con altas tasas de mortalidad en larvas de cuarto instar, *Cunninghamella* sp. se aisló creciendo sobre huevos y *Beauveria bassiana* se aisló de adultos. La patogenicidad de *B. bassiana* sobre adultos de *Lutzomyia* sp. se verificó en un estudio de susceptibilidad *in vitro* comparando dos aislamientos fúngicos y una formulación comercial; esta prueba se efectuó exponiendo los insectos a superficies tratadas (papel Wattman #1) con  $4 \times 10^6$  esporas/ml. Los insectos fueron susceptibles a todos los aislamientos, observándose los mayores porcentajes de mortalidad al cuarto día después de la exposición. Para el aislamiento Bb 9105 que presentó los mayores índices de patogenicidad, se determinó una  $DL_{50}$  de  $7 \times 10^6$  esporas/ml y un  $TL_{50}$  de 67,5 horas. La acción del hongo se evidenció por la esporulación sobre los insectos muertos, y mediante estudio de microscopía electrónica se observó en detalle el proceso de invasión post mortem del hongo sobre el insecto.

**Palabras Claves:** Hongos entomopatógenos, *Lutzomyia*, *Beauveria bassiana*, Flebotomíneos, *Fusarium* sp., *Conidiobolus* sp., *Paecilomyces* sp. Identificación.

## Introducción

Los flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de los géneros *Phlebotomus* para el Viejo Mundo y *Lutzomyia* para el Nuevo Mundo, son responsables de la transmisión de la leishmaniosis, cuyo agente causal es el protozoo tripanosomático del género *Leishmania*. Esta enfermedad presenta un complejo ciclo de transmisión que involucra, además del insecto vector, un reservorio vertebrado, lo cual dificulta las medidas de control.

En el hombre, el parásito afecta piel, mucosas y órganos del sistema mononuclear fagocítico, produciendo los cuadros clínicos de leishmaniosis cutánea, monocutánea y visceral (Chang y Bray 1985). Los flebotomíneos también transmiten otros patógenos de vertebrados como *Bartonella*, *Plasmodium* y *Hemogregarinas*, y tripanosomas de reptiles y anfibios (Killick - Kendrick et al. 1976; Mc.Conel y Correa 1964; Young 1979).

En el trópico, donde las enfermedades transmitidas por vectores, especialmente insectos, constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, la disminución del contacto hombre-vector es considerada como una importante estrategia en la interrupción del ciclo de transmisión. La aplicación de insectici-

das de efecto residual, como DDT, ha sido ampliamente utilizada para el control de los vectores, y más recientemente los piretroides, como la deltametrina, impregnados en cortinas y mosquiteros (Lane 1991).

Ante la aparición de resistencia a insecticidas como en el flebotomíneo *P. papatasi* (Scopoli) a DDT (Lane 1991) y otros vectores, cobra importancia el concepto de control integrado del vector, y el control microbiológico empieza a ser considerado. Este tipo de control ha proporcionado resultados preliminares satisfactorios para otros insectos transmisores de enfermedades, como malaria y tripanosomiasis (Lane 1991; OMS 1990).

Éste es un estudio preliminar sobre la identificación de hongos entomopatógenos para *Lutzomyia* spp. y un reconocimiento de aquellos con uso potencial como agentes de control.

## Materiales y Métodos

Los insectos para la realización del estudio se capturaron en los municipios de San Carlos y San Rafael (Ant.), zonas donde es común el cultivo de café como medio de subsistencia. Para la captura se emplearon trampas de luz Shannon y CDC que aprovechan el fototropismo positivo de los insectos, complementadas con capturadores manuales; estas trampas se colocaron en el interior de los cafetales, y los especímenes obtenidos se transportaron al Servicio de Leishmaniosis en Medellín, donde se realizaron las pruebas de laboratorio.

## Hongos asociados con estados inmaduros de *Lutzomyia* sp.

Las hembras de *Lutzomyia* sp. alimentadas con sangre de hamster se confinaron en recipientes para oviposición y se mantuvieron a 24°C y 95% de humedad relativa. Los huevos se observaron desde la postura hasta la eclosión y se siguió el posterior desarrollo de los instares larvales; cuando se evidenció presencia de hongos en los huevos o en las larvas, se realizaron aislamientos, los cuales se cultivaron en medios adecuados para el cre-

1. Biólogo e Ing. Agrónoma, respectivamente. Servicio de Leishmaniosis, Universidad de Antioquia. Apartado Aéreo 1226. Medellín, Colombia.

2. M.D. Tropicalista, M.Sc. Servicio de Leishmaniosis, Universidad de Antioquia. Apartado Aéreo 1226. Medellín, Colombia.

cimiento de hongos, como el Sabouraud - Dextrosa - Agar (SDA) y Papa - Dextrosa - Agar (PDA).

La identificación se realizó a partir de los cultivos puros mediante claves taxonómicas, en el laboratorio de Micología de la Universidad de Antioquia. Para observar las estructuras morfológicas del hongo y detalles sobre la infección, se realizaron montajes de las larvas infectadas en placas microscópicas, previa tinción con azul de lactofenol.

### Hongos asociados con adultos de *Lutzomyia* sp.

Para las capturas de adultos, las trampas se colocaron al interior de dos cafetales de San Carlos y San Rafael, el primero con una aplicación previa del hongo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetos) para el control de la broca del café y el segundo con un porcentaje de infección natural por el hongo del 95%, según los registros del Comité de Cafeteros de Antioquia.

El muestreo se realizó en esta forma, ya que reportes previos señalan la susceptibilidad de los flebotomíneos a este entomopatógeno y por conocerse de antemano la presencia de insectos potencialmente transmisores de *Leishmania* sp. en los ecosistemas cafeteros.

Los adultos procedentes del campo que llegaron sin vida al laboratorio, así como las hembras que murieron después de la oviposición, se depositaron en cajas de petri con papel filtro húmedo o directamente sobre medios artificiales de cultivo. Mediante observación al estereomicroscopio se evaluó la presencia de hongos, los cuales se aislaron y cultivaron para su posterior identificación. Igualmente se prepararon placas microscópicas con los insectos que presentaron invasión. En total se hicieron observaciones sobre 1.540 adultos de *Lutzomyia* sp.

### Pruebas de susceptibilidad in vitro

Las pruebas de susceptibilidad se realizaron sobre adultos capturados en el campo, en zonas sin previa aplicación del

hongo para evitar al máximo la contaminación, y consistieron en exponer los insectos a superficies tratadas, en este caso, papel filtro impregnado con soluciones conidiales ( $4 \times 10^6$  conidias/ml) durante 30 minutos. Los aislamientos del hongo, cada uno identificado como un tratamiento, aparecen en la Tabla 1. Se utilizó el sistema de bioensayo, diseñado por la OMS para determinar susceptibilidad o resistencia de mosquitos a insecticidas.

El experimento se llevó a cabo bajo un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos, cada uno con dos repeticiones (30 insectos por repetición) y los respectivos controles. Se hicieron observaciones dos veces al día, registrando el número de insectos muertos por día para cada tratamiento.

### Esporulación y potencial de inóculo del hongo *B. bassiana* sobre *Lutzomyia* sp.

Se registro el número de insectos muertos sobre los cuales esporuló el hongo y el número promedio de conidias producidas por insecto en cada uno de los tratamientos, para lo cual se tomaron al azar cuatro insectos esporulados por tratamiento y se suspendieron en un ml de agua destilada estéril con Tween 80 al 0,025%. El número de conidias se determinó mediante conteo en un hemocitómetro.

### Determinación de la $DL_{50}$ y el $TL_{50}$

Para el aislamiento al cual las *Lutzomyia* fueron más susceptibles, se determinaron los valores de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) y el tiempo letal medio ( $TL_{50}$ ) mediante un análisis probit.

La observación y registro de la mortalidad se realizó cada seis horas hasta obtener la mortalidad total de los insectos, incluyendo el grupo control.

## Resultados y Discusión

### Fauna flebotomínea

En el interior de los cafetales se verificó la presencia de tres especies de *Lutzomyia*: *Lu. bifoliata*, *Lu. yuilli* y *Lu. gomezi* (Nitzulescu), esta última de carácter antropofílico e incriminada como transmisora de *Leishmania panamensis* (Vélez 1989; Desjeux 1992.)

La presencia de flebotomíneos en ecosistemas cafeteros ha sido reportada por varios autores (Alexander 1987; Warburg et al. 1991), quienes señalan que los cafetales constituyen un ecosistema apto para el desarrollo de estos insectos, convirtiendo estas zonas en áreas potenciales para la transmisión de la enfermedad.

### Hongos asociados con estados inmaduros:

Se realizaron aislamientos fúngicos tanto de huevos como de larvas. *Cunninghamella* sp. se aisló de huevos de *Lutzomyia* sp., y a partir de cultivos puros aislados de larvas se identificaron los hongos *Cnidobolus* sp., *Paecilomyces* sp., *Fusarium oxysporum* (Schl.) Snyd. et Hans. y *Aspergillus* sp.

El parasitismo, en especial de *Fusarium*, fue claramente observado sobre las larvas que presentaron invasión en la cutícula y partes bucales.

Tabla 1. Procedencia e identificación de los aislamientos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. utilizados en pruebas de susceptibilidad para *Lutzomyia* sp.

Tratamiento	Procedencia	Designación
1	Comité de Cafeteros de Antioquia San Rafael (Ant.)	Aislamiento 9105? (cepa Federación)
2	CENICAFE (Dpto. Caldas)	Aislamiento 9002
3	Producto comercial	Bassianil
4	Servicio Leishmaniosis. U. de A. (Medellín)	Aislamiento 9401 sl (cepa San Carlos)

\* Información suministrada por el técnico de la zona pero que no pudo ser verificada.

**Hongos asociados con adultos**

A partir de los aislamientos realizados sobre adultos se identificaron los siguientes hongos: *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Rhodotorula* y *B. bassiana*. *Aspergillus* sp. y *B. bassiana* fueron aislados por Warburg (1991) sobre *P. papatasi* y *Lu. longipalpis* (Lutz & Neira). La acción de *Aspergillus* sp. fue determinada como oportunista, mientras que la patogenicidad de *B. bassiana* se verificó mediante pruebas de susceptibilidad.

Ya que el hongo *B. bassiana* se aisló de adultos capturados en zonas con previa aplicación del hongo para control de la broca del café, no puede afirmarse que se trate de infecciones naturales, ya que las aplicaciones podrían estar favoreciendo el contacto hongo-insecto y generando epizootias en el campo.

Aunque muchas especies de *Fusarium* poseen una reconocida acción oportunista, *F. oxisporum* ha sido reconocido como patógeno primario de insectos dípteros, y algunos autores consideran especies de este género como importantes elementos de control microbiológico (Steinkrauss y Kramer 1987).

**Pruebas de susceptibilidad**

Los adultos de *Lutzomyia* sp. fueron susceptibles *in vitro* a los diferentes aislamientos del hongo *B. bassiana* y al producto comercial. La Figura 1 muestra los porcentajes de mortalidad diaria de adultos de *Lutzomyia* sp. para los diferentes aislamientos. El aislamiento Bb 9105 (cepa Federación) causó las tasas más altas de mortalidad diaria (13 adultos / día), seguido por los aislamientos Bb 9401 s1 (cepa San Carlos 1), Bb 9002 y el producto comercial. La Figura 2 muestra los porcentajes de mortalidad acumulada causada por cada uno de los aislamientos, y puede observarse que el 100% de mortalidad con los aislamientos Bb 9105, Bb 9002 y Bb 9401s1 se presentó al cuarto día después de la exposición al hongo; estos resultados concuerdan con lo encontrado por Warburg (1991), quién registró el 100% de mortalidad para *P. papatasi* y *Lu. longipalpis* entre los cuatro y seis días

después de la exposición, en contraste con un 14% en el control. El porcentaje de mortalidad en el control, en el presente experimento, puede atribuirse a mortalidad natural, manipulación o contaminación natural con microorganismos patógenos.

**Potencial de inoculo:**

Esporulación del hongo *B. bassiana* se obtuvo en los insectos tratados aunque no en la totalidad de ellos. La Figura 3 muestra el número de insectos esporulados por cada tratamiento que varió entre 28 (48%) para el aislamiento Bb 9002 y 33 (55%)

para el aislamiento Bb 9105 (cepa Federación).

La Figura 4 muestra el promedio de conidias producidas por insecto con los diferentes aislamientos, siendo el aislamiento Bb 9105 el que presentó mayor esporulación ( $1,17 \times 10^6$  esporas/ml).

Estos hallazgos ratifican que además de ser susceptible al hongo entomopatógeno, el insecto infectado puede convertirse en fuente de inóculo para perpetuar las epizootias en el campo.

La observación al microscopio electrónico de barrido sobre la invasión post mor-

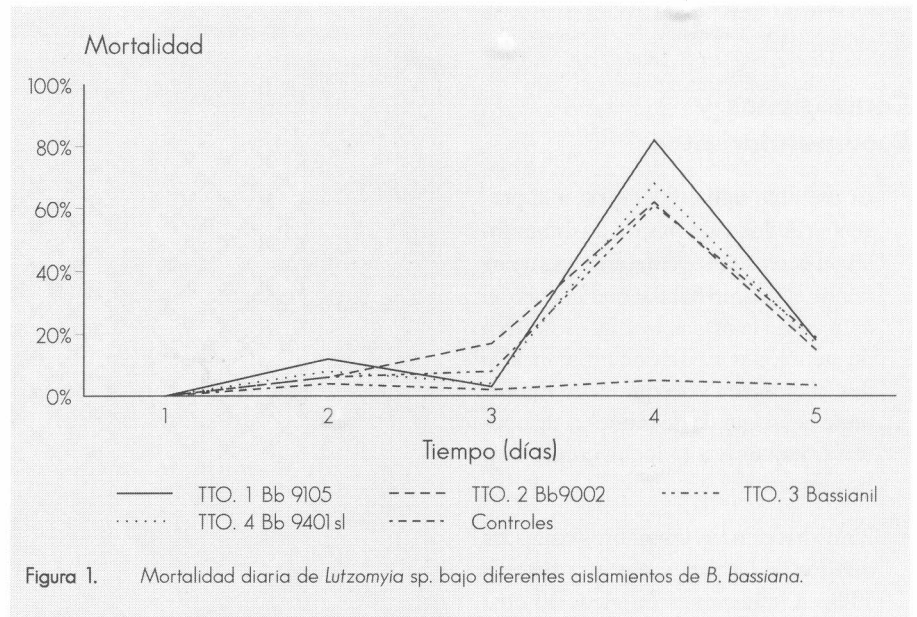


Figura 1. Mortalidad diaria de *Lutzomyia* sp. bajo diferentes aislamientos de *B. bassiana*.

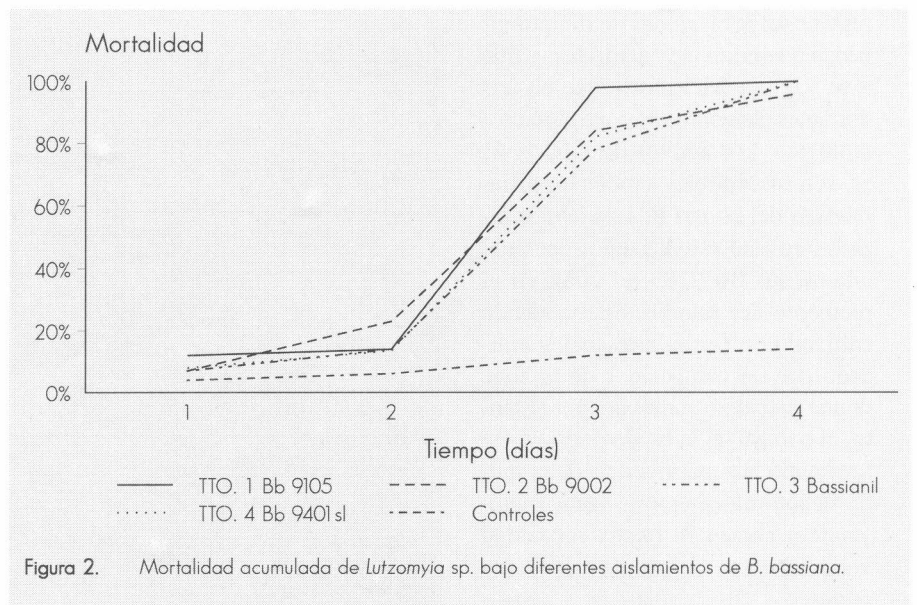


Figura 2. Mortalidad acumulada de *Lutzomyia* sp. bajo diferentes aislamientos de *B. bassiana*.

tem permitió determinar que las principales estructuras involucradas corresponden a las regiones interpleurales y a los puntos de unión de las articulaciones, características éstas que concuerdan con las descritas por Arora (1987) para insectos afectados por muscardina blanca.

**DL<sub>50</sub> Y TL<sub>50</sub>**

Para el aislamiento Bb 9105, con el cual se obtuvieron los mayores porcentajes de mortalidad diaria y las mejores características de esporulación sobre la *Lutzomyia*, se determinó mediante un análisis probit 95% (Tabla 2) que es necesaria una concentración de  $7,1 \times 10^6$  esporas y un tiempo de 67 horas para obtener el 50% de mortalidad.

**Conclusiones y Recomendaciones**

- El presente trabajo demuestra la presencia de los vectores de leishmaniosis en ecosistemas cafeteros, compartiendo el mismo hábitat con plagas del café como la broca, lo cual es motivo de atención por parte de las autoridades nacionales y lo que hace importante la búsqueda de modelos de control orientados a la lucha contra ambos insectos.
- Tanto los estados inmaduros como los adultos de *Lutzomyia* sp. son susceptibles a infecciones fúngicas, lo cual sugiere que estos patógenos pueden regular las poblaciones de flebotomíneos en condiciones naturales, y que a su vez pueden constituirse en importantes elementos de control microbiológico. Los adultos de *Lutzomyia* sp. son susceptibles a todos los aislamientos del hongo *B. bassiana* utilizados en este estudio, en especial al aislamiento Bb 9105, el cual, en el momento del estudio, estaba siendo cultivado en forma artesanal y aplicado por los campesinos de la zona donde se realizó el trabajo; por lo tanto, el control de la broca podría estar mediando la supervivencia de la fauna flebotomínea en esta zona, incluyendo especies de buena capacidad vectorial como *Lu. gomezi* y *Lu. hartmanni*.

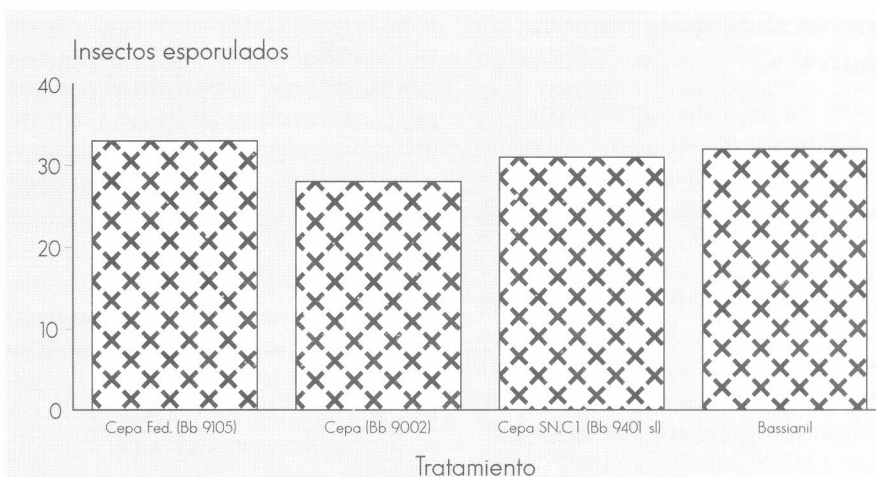


Figura 3. Número de insectos esporulados según el tratamiento.

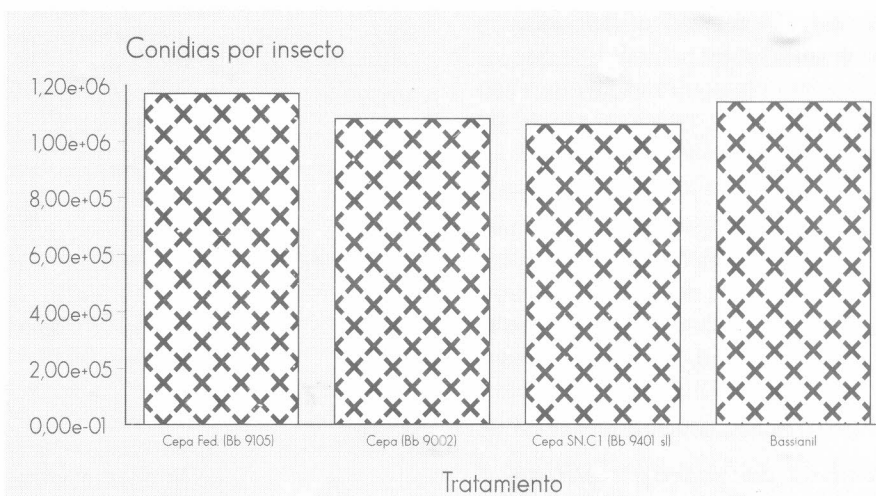


Figura 4. Promedio de conidias producidas por insecto.

Tabla 2. Análisis Probit (95%) Dosis letal media (DL<sub>50</sub>) y Tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) de *Beauveria bassiana* sobre *Lutzomyia* spp. (6 tratamientos, dos repeticiones, 6 controles).

Número de insectos utilizados: 360  
Número de muertos en el Testigo: 18

Dosis	Concentración conidias/ml	Mortalidad Corregida	Probits calculados
1	0,100	18,5	4,16
2	0,310	7,4	3,59
3	1,000	11,1	3,78
4	3,100	11,1	3,80
5	10,000	20,4	4,17
6	31,000	27,8	4,45

DL50: %170995,187 conidias/ml DL90: %53,805E+00 conidias/ml  
Límites: 3,139 % 32,338E+00 Límites: 6,914 % 11,799E+02

Ecuación de la línea de regresión ponderada: Y=0,2 X+ 3,54

CHI2: 8,672

5% Probabilidad <50%

- Este es un estudio preliminar, por lo cual es necesario considerar la realización de trabajos encaminados a esclarecer la interacción *Lutzomyia*-hongo *B. bassiana* con otros aislamientos y verificar el comportamiento del hongo en el campo, vigilando las áreas donde se realizan las aplicaciones en relación con la densidad de *Lutzomyia* sp.

## Bibliografía

- ALEXANDER, B. 1987. Dispersal of Flebotominae sandflies in a Colombia coffee plantation. *Journal of Medical Entomology* (Estados Unidos) v. 24, p.522-528
- ARORA, D. 1987. Entomopatogenic fungi. *Handbook of Applied Mycology*. New York. v. 2 no. 1, p. 215
- CHANG, K. P.; BRAY, R.S. 1985. Leishmaniasis. *Human Parasitic Diseases*. v. 1 no. 1, p.54-31
- DESJEUX, P. 1992. Information on the epidemiology and control of the Leishmaniasis in Colombia. WHO/LEISH/91.30. p.38-39.
- KILLICK-KENDRICK; LEANEY, A.J.; MOLINEUX, D.H.; RIOUX. 1976 Parasites of *Phlebotomus ariasi*. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Transactions* (Reino Unido) v.70 no.22, p.123-150.
- LANE, P. P. 1991. The contribution of sunfly control to Leishmaniasis control. *Control of insects vectors of disease*. v.71 Sup. 65,15p.
- Mc. CONNEL, E.; CORREA, I. 1964 Trypanosomes and other microorganisms from panamanian *Phlebotomus* sunflies. *Journal of Parasitology* (Estados Unidos) v.50, p.523-528.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 1990. Lutte contre les Leishmanioses. *Informes Técnicos* (Naciones Unidas) v.793, p.177
- STEINKRAUS, D.; KRAMER. P. 1987. Susceptibility of sixteen species of Diptera to the pathogen fungal. *Mycopatologia* (Holanda) v.100, p.55-63.
- VELEZ I. D. et. al 1989. Epidemiología de la Leishmaniosis tegumentaria Americana. *Fauna flebotomina de Antioquia. Boletín del Servicio Seccional de Salud de Antioquia* (Colombia) v.35, p.138.
- WARBURG, A. et. al. 1991. Leishmaniasis vector potential of *Lutzomyia* spp. in Colombian coffee plantations. *Medical and Veterinary Entomology* (Estados Unidos) v.5, p. 9-16.
- 1991. Entomopathogens of flebotomins, Biological control. *Bulletin of First International Symposium of Phlebotominae Sandflies*. v.1, p.107.
- YOUNG, D.G. 1979. A review of the bloodsucking psychodid flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). *University of Florida, Agricultural Experiment Station, Gainesville*. 266p. (Technical Bulletin no.30).