

	MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN TAXÓNOMICA DE VECTORES DE LEISHMANIASIS LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	Código	MI-GS-MA-84
		Versión	0
		Fecha de aprobación	09/08/2023
		Página	1 de 11

República de Colombia



Gobernación de Santander

MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN TAXÓNOMICA DE VECTORES DE LEISHMANIASIS

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Javier Alonso Herrera	Elisa Inés Romero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN TAXÓNOMICA DE VECTORES DE LEISHMANIASIS LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	Código	MI-GS-MA-84
		Versión	0
		Fecha de aprobación	09/08/2023
		Página	2 de 11

CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	3
2. ALCANCE	3
3. RESPONSABILIDADES.....	3
4. DEFINICIONES.....	3
5. CONDICIONES GENERALES	4
6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO.....	5
7. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS	5
8. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	5
9. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA	6
10. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO	6
10.1 MÉTODOS DE LIMPIEZA Y ACLARAMIENTO DE LOS FLEBOTOMOS.....	6
10.1.1 LACTOFENOL	6
10.1.2 KOH AL 10% Y FENOL LIQUIDO	7
10.1.3 DESHIDRATACION CON ALCOLHOLES- FENOL LIQUIDO.....	7
10.2 DETERMINACION TAXONOMICA DE FLEBOTOMOS.....	7
10.3 MONTAJES Y / O PRESERVACION DE LOS FLEBOTOMOS	9
11. EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS.....	10
12. DOCUMENTOS DE REFERENCIA	10
13. ANEXOS	11
14. CONTROL DE CAMBIOS	11

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Javier Alonso Herrera	Elisa Inés Romero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN TAXÓNOMICA DE VECTORES DE LEISHMANIASIS LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	Código	MI-GS-MA-84
		Versión	0
		Fecha de aprobación	09/08/2023
		Página	3 de 11

1. OBJETIVO

Brindar la información sobre los procedimientos de laboratorio para la determinación taxonómica y preservación de flebotomos.

2. ALCANCE

Este documento será tomado como referencia en el LDSP de Santander para la realización de montajes permanentes y no permanentes de adultos de flebotomos.

3. RESPONSABILIDADES

Los encargados de llevar a cabo las actividades del presente documento serán los profesionales y técnicos calificados del grupo de Entomología bajo la supervisión del Coordinador del grupo.

4. DEFINICIONES

Agujas de disección: son agujas muy finas montadas en un cabo de madera utilizadas en entomología principalmente para desarticular los insectos o manipularlos en los procesos de montaje y preservación.

Bálsamo de Canadá: resina utilizada para preservar ejemplares en montajes permanentes microscópicos realizados en laminas portaobjetos y cubreobjetos.

Determinación taxonómica: es la identificación científica de los ejemplares de forma jerárquica y sistemática mediante el uso de claves dicotómicas.

Espermatecas: son estructuras quitinosas pares, de forma variada según la especie. Se encuentran en el interior del abdomen entre el 7 y 8 segmento formando parte del aparato reproductor de los flebotomos hembra. La función es almacenar esperma y es de gran importancia en los estudios de taxonomía.

Fenol líquido: sustancia química utilizada en entomología para preservación y montajes permanentes de insectos.

Fuscina ácida: sustancia química de color magenta utilizada en histología para dar color a los diferentes tejidos.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Javier Alonso Herrera	Elisa Inés Romero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia Departamento de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN TAXÓNOMICA DE VECTORES DE LEISHMANIASIS LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	Código	MI-GS-MA-84
		Versión	0
		Fecha de aprobación	09/08/2023
		Página	4 de 11

KOH: Hidróxido de potasio. Sustancia inodora utilizada para aclarar la cutícula de los insectos.

Montajes permanentes: son técnicas de preservación de ejemplares para ser utilizados como colección de referencia.

5. CONDICIONES GENERALES

- El procedimiento se realizará en muestras debidamente registradas y rotuladas con los códigos de ingreso del LDSP y de la UBE.
- El material entomológico a procesar debe estar previamente seleccionado macroscópicamente y depositado en viales con alcohol al 70%.
- El área de trabajo debe contar con cámara de extracción de aire ó con buena ventilación para evitar la acumulación de vapores tóxicos.
- El área de trabajo debe contar con buena fuente de agua (lavamanos o ducha de seguridad) para situaciones de emergencias por derrame o salpicaduras de sustancias tóxicas.
- El profesional que realice el procedimiento debe asegurarse de portar apropiadamente sus implementos de bioseguridad como bata manga larga, guantes de nitrilo, careta protectora con filtro o gafas de protección y tapabocas.
- Disponer de frascos de vidrio oscuro con tapa para el descarte de los residuos químicos.
- El procedimiento de limpieza y desinfección se debe realizar según el protocolo del laboratorio
- Disponer de la microscopia adecuada (contar mínimo con un microscopio con objetivos de 10x, 40x con reglilla y 100x en excelente estado y con un estereoscopio).

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Javier Alonso Herrera	Elisa Inés Romero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN TAXÓNOMICA DE VECTORES DE LEISHMANIASIS LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	Código	MI-GS-MA-84
		Versión	0
		Fecha de aprobación	09/08/2023
		Página	5 de 11

6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Los montajes permanentes de insectos son de gran importancia en el área de las ciencias naturales y de la salud, ya que facilitan la determinación taxonómica de los ejemplares y constituyen la base de las colecciones entomológicas; las cuales representan el patrimonio natural de una región y el conjunto de especímenes con destacada importancia investigativa.

7. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS

- Los tiempos de exposición de los ejemplares al KOH y el cambio del ejemplar de una solución a otra pueden ocasionar la compresión o daño de las espermatecas y otras estructuras internas y externas de los flebótomos.
- El uso del microscopio en mal estado impide la observación de los caracteres diagnósticos de los ejemplares.
- El uso del estereoscopio en mal estado dificulta la manipulación y disección de los ejemplares para la realización de los montajes.

8. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Una vez capturados los flebótomos adultos, se matan preferiblemente con vapores de cloroformo o éter. También se pueden matar con frío, introduciéndolos en el congelador o en último caso dejándolos morir al medio ambiente en un recipiente con tapa. Para no dañar los ejemplares en la manipulación, deben tomarse con las pinzas entomológicas ó alfileres de disección de las alas, no de las patas ni del resto del cuerpo.

Para distinguir los flebótomos adultos de otras familias de insectos, se observa la forma del cuerpo que es como un bastón (tórax giboso), cuerpo hirsuto, de tamaño pequeño (2- 5 mm de longitud), patas largas, alas lanceoladas en posición de 45 grados con respecto al abdomen, ojos compuestos sin ocelos, antenas largas con 16 segmentos, abdomen de 10 segmentos (los tres últimos modificados para constituir la genitalia).

Las muestras pueden ingresar al laboratorio en seco o en alcohol al 70% debidamente rotuladas escritas a lápiz o con tinta indeleble.

El rotulo debe contener preferiblemente la siguiente información:

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Javier Alonso Herrera	Elisa Inés Romero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN TAXÓNOMICA DE VECTORES DE LEISHMANIASIS LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	Código	MI-GS-MA-84
		Versión	0
		Fecha de aprobación	09/08/2023
		Página	6 de 11

- Localidad (municipio, Vereda)
- Sitio de muestreo (intradomicilio, peridomicilio, bosque, etc.)
- Método de captura (trampa CDC, Trampa Shannon, cebo humano, etc.)
- Fecha de captura
- Número de flebotomos que van en el vial
- Coordenadas del sitio donde se recolectaron los ejemplares

Si es posible, se deben incluir datos meteorológicos (humedad, temperatura, pluviosidad)

9. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Previo a los procedimientos de aclaramiento y montajes para la determinación taxonómica, los ejemplares deben ser conservados en viales de vidrio o plástico inmersos en alcohol etílico al 70% debidamente rotulados.

Posterior a la determinación taxonómica, los ejemplares se pueden conservar en montajes permanentes o inmersos en lactofenol o fenol. También se pueden conservar en alcohol al 70%, pero esta preservación con alcohol imposibilita ver las estructuras internas de los flebotomos.

10. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Para poder determinar taxonómicamente los flebotomos hasta la especie, es necesario someterlos a un proceso de limpieza de los pelos y aclaramiento de la cutícula para hacer visible los caracteres diagnósticos de cada ejemplar y finalmente conservarlos mediante montajes permanentes o en viales con fenoles.

10.1 MÉTODOS DE LIMPIEZA Y ACLARAMIENTO DE LOS FLEBOTOMOS

10.1.1 LACTOFENOL

Es el método más rápido, se mezcla en un crisol (o capsula de porcelana) 1:1 (vol:vol) de ácido láctico y fenol. Se dejan los flebotomos 24 horas en esta solución o calentarlos en un hot plate (plato caliente) en baja intensidad sin dejarlo hervir. Una vez que el lactofenol se enfríe se pueden mirar los ejemplares en una gota de esta solución bajo el microscopio en aumentos de 10x y 40x.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Javier Alonso Herrera	Elisa Inés Romero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DE SANTANDER Gobernación de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN TAXÓNOMICA DE VECTORES DE LEISHMANIASIS LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	Código	MI-GS-MA-84
		Versión	0
		Fecha de aprobación	09/08/2023
		Página	7 de 11

10.1.2 KOH AL 10% Y FENOL LIQUIDO

Los ejemplares se dejan en un crisol con un poco de KOH al 10% por 24 horas o menos tiempo a temperatura ambiente y tapados con un Parafilm hasta que los ojos tornen una coloración rosado pálido o casi transparentes. Una vez aclarados, se lavan los ejemplares en un recipiente con agua destilada durante 5 minutos y luego se depositan en una gota de fenol líquido para ser observados en el microscopio en aumentos de 10x y 40x.

10.1.3 DESHIDRATACION CON ALCOLHOLES- FENOL LIQUIDO

Los ejemplares se dejan en un crisol con un poco de KOH al 10% por 24 horas o menos (14-16 horas) a temperatura ambiente.

Posteriormente, se someten a deshidratación con alcoholes, que consiste en el lavado sucesivo de las muestras con:

- Ácido acético glacial, durante un minuto.
- Fucsina acida durante 15 minutos.
- Ácido acético al 10%, durante 10 minutos.
- Alcohol al 70%, durante 10 minutos.
- Alcohol al 90%, durante 10 minutos.
- Alcohol al 95%, durante 10 minutos.
- Alcohol absoluto durante 10 minutos.

Una vez terminado el último lavado en alcohol, los ejemplares son traspasados a un vial con fenol líquido para ser observados en microscopio a 10x y 40x

10.2 DETERMINACION TAXONOMICA DE FLEBOTOMOS

Para la determinación taxonómica de los flebótomos se debe utilizar las claves dicotómicas de Young y Duncan, 1994 y Galati, 2009 a, b.

Las principales características para identificar las especies se encuentran en la genitalia masculina (Figura 1) y femenina (Figura 2), aunque se describen también estructuras importantes en el tórax como la coloración y en la cabeza como son la sutura interocular incompleta, la forma y número de dientes del cibario, largo de los flagelómeros y forma de los ascoides.

Los machos son más delgados y generalmente más pequeños que las hembras de la misma especie y se los distingue a simple vista por su aparato genital en forma de pinza o de mano en el extremo del abdomen, mientras que en las hembras el extremo es romo.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Javier Alonso Herrera	Elisa Inés Romero	Alejandra Galvis Vargas

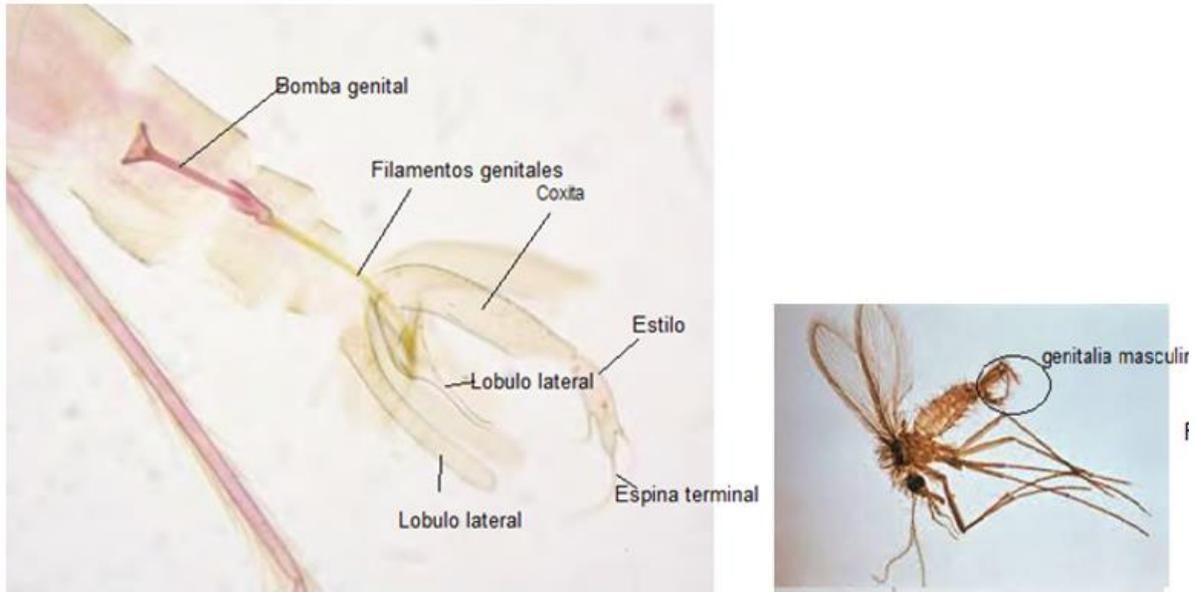


Figura 1. Genitalia masculina de lutzomyias

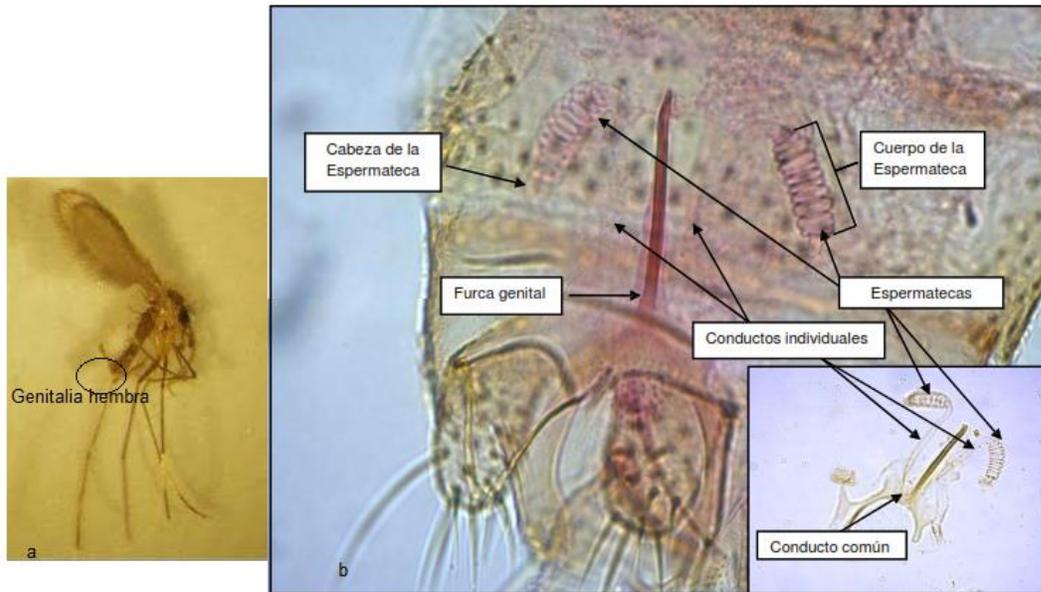


Figura 2. a. Vista macroscopica de la genitalia femenina de *Lutzomyia* spp. b. Vista microscopica de la genitalia femenina de *Lutzomyia* spp

En el proceso de la determinación taxonómica se recomienda ingresar en un formato todos los datos concernientes a la recolecta del ejemplar, así como el nombre específico del ejemplar (Ver Anexo 1)

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Javier Alonso Herrera	Elisa Inés Romero	Alejandra Galvis Vargas

	MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN TAXÓNOMICA DE VECTORES DE LEISHMANIASIS LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	Código	MI-GS-MA-84
		Versión	0
		Fecha de aprobación	09/08/2023
		Página	9 de 11

10.3 MONTAJES Y / O PRESERVACION DE LOS FLEBOTOMOS

- En la mitad de una lámina portaobjetos se adiciona una gota de fenol o lactofenol y se deposita el flebótomo.
 - Si el ejemplar es macho se le arreglan con un pincel entomológico todas las estructuras del cuerpo sin separarlas entre sí, de tal forma que se le vean todas las características diagnosticas de la genitalia. Esta manipulación se realiza en el estereoscopio.
 - Si el ejemplar es hembra, se separan la cabeza del tórax con una aguja de disección fina y se coloca la parte anterior de la cabeza hacia abajo (ojos y frente tocando la lámina portaobjetos y el foramen occipital hacia arriba en contacto con la lámina cubreobjeto) para que los dientes del cibario queden visibles, y luego se prosigue a organizar el resto del cuerpo sin separar sus partes entre si para que se vean todas las características diagnosticas principalmente de la genitalia. Si la genitalia no es visible, se separan con una aguja de disección los dos últimos segmentos del abdomen para extraer las espermatecas.
- Posteriormente, se ubica sobre el ejemplar una laminilla cubreobjetos y se le adiciona en los extremos unas góticás de bálsamo de Canadá hasta que el ejemplar quede poco a poco sumergido en el bálsamo sin que queden burbujas entre la lámina y laminilla (Ver figura 3).

Nota: Si las espermatecas fueron extraídas del abdomen, se ubican al lado derecho del ejemplar y se hace el montaje por separado del resto del cuerpo, pero sobre la misma lámina portaobjeto.

La laminilla cubreobjetos que se pone encima de la espermateca debe ser pequeña de acuerdo al tamaño de la estructura y se le adiciona gotas de bálsamo de Canadá como lo escrito en el párrafo anterior.



Figura 3. Montaje permanente de flebótomos.

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Javier Alonso Herrera	Elisa Inés Romero	Alejandra Galvis Vargas

 <p>República de Colombia Departamento de Santander</p>	MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN TAXÓNOMICA DE VECTORES DE LEISHMANIASIS LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	Código	MI-GS-MA-84
		Versión	0
		Fecha de aprobación	09/08/2023
		Página	10 de 11

- Por último, se rotula o etiqueta el montaje utilizando papel adhesivo para rotular y marcador de tinta negra indeleble.

La etiqueta de la derecha debe llevar: Nombre de la especie y el nombre de la persona que la identificó.

La etiqueta de la izquierda debe llevar: Localidad (País, departamento, municipio, Vereda), sitio de muestreo (intradomicilio, peridomicilio, bosque, etc.), método de captura (trampa CDC, Trampa Shannon, cebo humano, etc.), fecha de captura, coordenadas geográficas.

11. EMISIÓN DEL INFORME DE RESULTADOS

La emisión del informe se da con base en el origen del estudio de campo mediante un oficio remitario dando a conocer los nombres específicos de las especies encontradas y su importancia en salud pública.

12. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

CIDEIM. Manual de entomología médica para investigadores de América Latina. 1994

Galati, Eunice A Bianchi. 2009a. “Distribuição Geográfica Dos Phlebotominae (Diptera , Psychodidae) Das Américas.”

Galati. 2009b. “Phlebotominae (Diptera, Psychodidae), Classificação Morfologia e Terminologia e Identificação de Adultos.” atualização do capítulo 2-Morfologia e Taxonomia: 2,1, Classificação de Phlebotominae, pp. 23-51 e 2.2. Morfologia, Terminologia de Adultos e Identificação dos táxons da América, 53-75. In Rangel EF & Lainson R. (org.) Flebotomíneos do Brasil, Rio de. Vol. I. São Paulo, SP, Brasil, Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904.

Manual de procedimientos de identificación de vectores de leishmaniosis y enfermedad de Carrión. Serie de Normas técnicas N. 36. Lima 2002.

REDILA. Red de investigación de las leishmaniasis en Argentina. Vigilancia de insectos transmisores de leishmaniasis. 2015.

Young, D. G. & M. A. Duncan. 1994. Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sand Flies in Mexico, the West Indies, Central

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Javier Alonso Herrera	Elisa Inés Romero	Alejandra Galvis Vargas

 <i>República de Colombia</i> <i>Gobernación de Santander</i>	MANUAL PARA LA DETERMINACIÓN TAXÓNOMICA DE VECTORES DE LEISHMANIASIS LABORATORIO DEPARTAMENTAL DE SALUD PÚBLICA	Código	MI-GS-MA-84
		Versión	0
		Fecha de aprobación	09/08/2023
		Página	11 de 11

and South America (Diptera: Psychodidae) Florida, Memoirs of the American Entomological Institute 54, Associated Publishers, 881 p.

13. ANEXOS

Municipio	Localidad	Dirección	Latitud	Longitud	Altura (m.s.n.m)	Fecha captura	Método de captura	Hora de captura	Colector	Nombre específico	# hembras	# machos

Formato de registro de la determinación taxonómica

14. CONTROL DE CAMBIOS

CONTROL DE CAMBIOS				
VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	REVISÓ	APROBÓ
0	09/08/2023	Emisión inicial del documento	Alba Rocío Orduz Amézquita Líder Grupo LDSP German Eduardo Marín Cárdenas Director de Salud Integral Diego Sánchez Báez Coordinador Grupo de Apoyo a la Gestión y Calidad César Ernesto Sánchez Aranda Director de Planeación y Mejoramiento en Salud	Javier Alonso Villamizar Suarez Secretario de Salud de Santander

Versión	Elaboración	Revisión Técnica	Revisión de Calidad
0	Javier Alonso Herrera	Elisa Inés Romero	Alejandra Galvis Vargas