UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA ABUNDANCIA Y LA INFECCIÓN CON *Leishmania* spp. EN FLEBÓTOMOS DE UN ÁREA RURAL DE VILLAVICENCIO, META.

ADOLFO VASQUEZ TRUJILLO
Estudiante
Codigo: 598556

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Bogota, Colombia
2011

VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA ABUNDANCIA Y LA INFECCIÓN CON *Leishmania* spp. EN FLEBÓTOMOS DE UN ÁREA RURAL DE VILLAVICENCIO, META.

SEASONAL VARIATION OF THE ABUNDANCE AND INFECTION WITH *Lesihamania* spp. IN A SANDFLIES IN RURAL AREA OF VILLAVICENCIO, META.

ADOLFO VASQUEZ TRUJILLO
Estudiante
Codigo: 598556

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister Scientiae en Infecciones y Salud en el Trópico

Directora:

ERIKA SANTAMARIA HERREÑO
Licenciada en Biología y Química, MSc.

Codirector:

EDGAR PRIETO SUÁREZ
Profesor
Departamento de Salud Pública
Facultad de Medicina
Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Bogotá, Colombia
2011

Dedicado a:

Mi madre y mis hermanos que siempre me dieron todo el apoyo y motivación para seguir siempre adelante, a mi novia por su apoyo incondicional, amor, alegría y ánimo, y al grupo de la Unidad de Entomología del Meta y al Grupo de Entomología del INS por su constante acompañamiento.

Agradecimientos

A la Dra. Erika Santamaría Herreño y al Dr. Edgar Prieto Suárez por su apoyo en la dirección de este proyecto.

Olga Lucia Cabrera por su tiempo, por todas sus enseñanzas, sugerencias, y dirección en el desarrollo de este proyecto.

A Luz Stella Buitrago, por su paciencia, enseñanzas y asesorías que aportaron para la realización de este proyecto de investigación.

A mis compañeros de la unidad de Entomología por su tiempo dedicado a este trabajo.

A la Dra Martha Stella Ayala Sotelo, por su aporte con cepas de referencia de *Leishmania*.

A Jairo Enrique Palomares Velosa por sus aportes en el análisis estadístico.

A mi novia Angélica Elizabeth González Reina por su ayuda constante en el desarrollo del proyecto

A toda la comunidad de las veredas Barcelona, Cocuy y La Reforma que en diferente forma aceptaron participar y colaborar en el proyecto.

Al Instituto de Investigaciones de la Orinoquía Colombiana y la Secretaria Seccional de Salud del Meta por la financiación del proyecto.

A mi madre María Uraide Trujillo y mis Hermanos Fernando Vásquez Trujillo y Claudia Cristian Vásquez Trujillo por su apoyo y confianza en mi.

Resumen

Introducción: En Colombia, la leishmaniasis es una enfermedad endémica y el departamento del Meta es el segundo más incidente con una tasa de 441,2 casos x 100.000 habitantes, y uno de los focos activos se encuentra en zona rural de Villavicencio, al norte del departamento. Estudios realizados han descrito características entomológicas; por lo tanto, la identificación de componentes eco-epidemiológicos en la dinámica de transmisión de la enfermedad en la zona es una necesidad. **Objetivo:** Determinar la variación estacional, factores determinantes ambientales que influyen en la abundancia, e infección con *Leishmania* spp. en especies de *Lutzomyia* spp. presentes en zona endémica de leishmaniasis cutánea del municipio de Villavicencio. **Materiales y métodos:** El estudio se desarrollo en tres veredas, La Reforma, Barcelona y Cocuy del municipio de Villavicencio. Se realizó un muestreo preliminar usando trampas CDC de luz en el peridomicilio determinando Unidades de Seguimiento Estacional (USE), se muestrearon tres USE en intra, peri y extradomiciliar de Junio de 2008 a Mayo de 2009, y se tomaron 32 variables climáticas explicatorias. La detección de infección natural realizo con la técnica de PCR utilizando los iniciadores OL1 y OL2. **Resultados:** Se identificaron 20 especies de *Lutzomyia*, *L. antunesi* fue la especie mas abundante (19.689/22094-89,11%). Se encontró variación estacional en la población de *Lutzomyia* y *L. antunesi*, principalmente en bosques (F=5,142; P=0,0003954 y F=4,990; P=0,0004903 respectivamente), siendo la temporada seca de mayor abundancia (Diciembre, Enero, Febrero). Se identificaron como determinantes de abundancia la precipitación (r = -0,704; P< 0,05) y la Temperatura máxima 24 horas antes del muestreo (29-30° C) (r = 0,550; P< 0,05). Y se determino infección natural con *Leishmania* spp. en *L. gomezi* (10,3%), *L. panamensis* (4,85%), *L. flaviscutellata* (7,53%) y *L. antunesi* (1,02%), determinando la temperatura máxima 15 días antes del muestreo (>30,5° C) como principal factor de riesgo para la presencia de hembras de *L. antunesi* PCR positivas (Chi2=18,129; P< 0,0001), OR = 2,4 (IC= 1,586 - 3,649). **Conclusión:** los resultados del estudio proporcionan información que ayuda a entender parte de la dinámica de transmisión de la enfermedad en la zona e identifica vectores, determinantes de abundancia y factores de riesgo, herramientas para medidas de prevención y control.

Palabras clave: *Leishmania, Lutzomyia,* variación estacional, eco epidemiología, Colombia

Abstract

Introduction: In Colombia, leishmaniasis is endemic disease and the Department of Meta is the second most incident with a rate of 441,2 cases per 100.000 inhabitants, and one of the active centers are located in rural area of Villavicencio, north of Department. Studies have described entomological characteristics; therefore, the identification of eco-epidemiological components in the dynamics of disease transmission in the area is a necessity. **Objective:** To determine the seasonal variation, environmental factors that influence the abundance and infection with *Leishmania* spp. in species of *Lutzomyia* spp. present in cutaneous leishmaniasis endemic area of Villavicencio. **Materials and Methods:** This study was performed in three villages, La Reforma, Barcelona and Cocuy of the Villavicencio City. Preliminary sampling was conducted using CDC light traps in peridomestic determining Seasonal Monitoring Units (SMU), three SMU were sampled in intra-peri and peridomiciliary of June 2008 to May 2009, and were taken 32 climatic explanatory variables. The detection of natural infection performed with PCR using the primers OL1 and OL2. **Results:** We identified 20 species of *Lutzomyia*, *L. antuensi* was the most abundant species (19.689/22.094 - 89,11%). Seasonal variation was found in the population of *Lutzomyia* and *L. antunesi*, mainly in forests (F = 5,142; P = 0,0003954 and F = 4,990; P = 0,0004903, respectively), being the most abundant dry season (December, January, February). Was identified as a determinant of abundance the precipitation (r = -0,704, P <0,05) and maximum temperature 24 hours before sampling (29-30 ° C) (r = 0,550, P <0,05). And it was determined natural infection with *Leishmania* spp. in *L. gomezi* (10,3%), *L. panamensis* (4,85*%), L. flaviscutellata* (7,53%) and *L. antunesi* (1,02%), determining the maximum temperature 15 days before sampling (> 30,5 ° C) as the main risk factor for the presence of females of *L. antunesi* positive PCR (Chi2 = 18,129; P <0,0001), OR = 2,4 (CI = 1,586 to 3,649). **Conclusion:** The results of the study provide information that helps to understand some of the dynamics of disease transmission in the area and identifies vectors, determinants of abundance and risk factors, tools for prevention and control.

Key words: *Leishmania, Lutzomyia,* seasonal variation, eco epidemiology, Colombia.

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN 13

Planteamiento del problema 15

Hipótesis 18

Objetivo general 18

Objetivos específicos 18

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS 19

1.1 Leishmaniasis 19

1.2 Ciclo de vida del parásito 19

1.3 Vectores 21

1.4 Determinantes ambientales de abundancia 22

1.4.1 Temperatura 24

1.4.2 Precipitación 24

1.4.3 Humedad relativa 25

1.5 Detección de infección natural 25

2. MATERIALES Y MÉTODOS 27

2.1 Área de estudio 27

2.2 Muestreo línea base 27

2.3 Muestreo estacional 28

2.3.1 Variables explicatorias de abundancia de *Lutzomyia* 29

2.3.2 Variables fisiológicas 29

2.4 Determinación de infección natural 34

2.4.1 Protocolo de extracción de ADN de ejemplares de *Lutzomyia*. 35

2.4.3 Valoración de la sensibilidad de la prueba al número máximo de *Lutzomyia* por grupo y validación de la PCR con iniciadores OL1 y OL2 35

2.4.4 Validación de los iniciadores OL1 y OL2 36

2.5 Determinación taxonómica 36

2.5.2 Determinación taxonómica de las hembras procesadas por PCR 37

2.5.3 Características generales de cada Subgénero, Grupo o especie 37

2.5.4 Control de calidad de la identificación de especies 38

2.6 Análisis estadístico 39

2.6.1 Variación estacional y determinantes ambientales 39
2.6.2 Asociación entre variables fisiológicas y tasa de infección natural con determinantes ambientales 40
3. RESULTADOS 41
3.1 Muestreo línea base 41
3.2 Determinación de variación estacional de especies de *Lutzomyia* en el área endémica. 41
3.2.1 Composición de especies para cada zona de muestreo 41
3.2.2 Variación estacional 46
3.3 Determinantes ambientales que influyen en la abundancia estacional de las especies de *Lutzomyia*. 51
3.3.1 Análisis de componentes principales (ACP) de los determinantes ambientales 51
3.3.2 Determinantes ambientales de abundancia de insectos del género *Lutzomyia*. 51
3.3.3 Correlación de Pearson y modelación de variables de abundancia y temperatura por regresión lineal 53
3.4 Determinación de tasas de infección mensual de especies del género *Lutzomyia* con *Leishmania* spp. y su asociación con determinantes ambientales 54
3.4.1 Valoración de la sensibilidad de la prueba de la PCR 54
3.4.2 Tasa de infección natural mensual de especies del género *Lutzomyia* con *Leishmania* spp 55
3.4.3 Correlación y asociación entre determinantes ambientales y variables fisiológicas de *L. antunesi* e infección natural con *Leishmania* spp. 56
4. DISCUSIÓN 58
5. CONCLUSIONES 64
6. RECOMENDACIONES 65
7. BIBLIOGRAFÍA 66
ANEXOS 75

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Incidencia de leishmaniasis cutánea por entidad territorial, 2010 ……16

Tabla 2. Variables independientes que podrían explicar la abundancia de insectos del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio..…….....30

Tabla 3. Variables dependientes, abundancia de insectos del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio..……..……...32

Tabla 4: Muestreo línea base de abundancia peridomiciliar de especies del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio….……...42

Tabla 5. Abundancia intradomiciliar mensual de las especies del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio……..….…43

Tabla 6. Abundancia peridomiciliar mensual de las especies del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio …….…….44

Tabla 7. Abundancia extradomiciliar mensual de las especies del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio ……...……...45

Tabla 8. Determinación de la variación estacional del total de las especies del género *Lutzomyia* y las principales especies de importancia médica en zona rural de Villavicencio……....46

Tabla 9. Determinación de la variación estacional de especies del género *Lutzomyia* por medio de pruebas de comparaciones múltiples (Tukey) para los grupos que presentaron valores significativos en el ANOVA ……...……...47

Tabla 10. Correlación entre el total de las especies del género *Lutzomyia* capturadas en cada hábitat y el total de las especies de importancia médica…….48

Tabla 11. Correlación entre la abundancia de insectos del género *Lutzomyia* total y extradomiciliar y riqueza total e intradomiciliar con los días de lluvia.……..49

Tabla 12. Determinantes ambientales de abundancia de especies del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio……..……52

Tabla 13. Temperatura como determinante ambiental de abundancia de especies de *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio ……...53

Tabla 14. Tasa de infección natural mensual para el total de insectos del género *Lutzomyia*, por zona de muestreo y para las especies de importancia médica….……...55

Tabla 15. Correlación entre determinantes ambientales y variables fisiológicas de *L. antunesi* en zona rural de Villavicencio…….…….56

Tabla 16. Odds Ratio de los determinantes ambientales correlacionados con variables fisiológicas y proporción de infección mensual...……...57

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Esquema del ciclo biológico ……...20

Figura 2. Mapa del Municipio de Villavicencio, veredas de estudio. …….……...27

Figure 3. Etapas en el desarrollo de la infección por *Leishmania* en *Lutzomyia*, aparición secuencial de formas morfológicas de promastigotes y su ubicación en los diferentes aspectos del intestino (Sacks y Kamhawi, 2001)……34

Figura 4. Variación estacional del total de insectos del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio, Meta, 2008-2009. Abundancia total y extradomiciliar vs. número de días de lluvia (A), riqueza total e intradomiciliar vs. número de días de lluvia (B)……..50

Figura 5. Sensibilidad de la PCR con los incitadores OL1 y OL2. Cantidades crecientes de flebótomos desde 1 hasta 30 ejemplares, cada grupo con 10 parásitos de *L. chagasi*/10µl……54

LISTA DE ANEXOS

Pág.

Anexo 1. Ensayo de determinación de la altura para la trampa CDC en el extradomicilio……..75

Anexo 2. Modelo de regresión lineal y Calida del modelo de *L. gomezi* extradomiciliar y la temperatura media en °C del día de la recolección……..….76

Anexo 3. Modelo de regresión lineal y calidad del modelo entre el total de *Lutzomyia* capturadas en el intradomicilio y la temperatura máxima en °C 24 horas antes de la recolección……...77

Anexo 4. Modelo de regresión lineal y calidad del modelo del total de *L. gomezi* capturadas y la temperatura media en °C del día de la recolección…….……...78

Anexo 5. Modelo de regresión lineal y calidad del modelo del total de *Lutzomyia* capturadas en el peridomicilio y la temperatura máxima en °C 24 horas antes de la recolección……...79

Anexo 6. Descripción de características fisiológicas presentes en los grupos de hembras de *Lutzomyia* positivas a la PCR…….80

Anexo 7. Patrón de abundancia mensual del total de *Lutzomyia* en la zona endémica, y para *L. gomezi* asociada a los principales determinares ambientales para cada caso…..81

INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades zoonóticas y enzoóticas causadas por protozoarios del género *Leishmania* (Kinetoplastida: Tripanosomantidae) (Ashford, 2000), transmitida en el Nuevo Mundo por insectos dípteros hematófagos del género *Lutzomyia* (Ferro y Morales, 1998). En el mundo existen cerca de 12 millones de personas que sufren la enfermedad y cada año se presentan cerca de 2 millones de casos nuevos (OMS, 2000).

En Colombia, las leishmaniasis son enfermedades endémicas y la forma clínica más frecuente es la leishmaniasis cutánea (LC) con el 95% de los casos. Para el año 2010, el número de casos registrados de leishmaniasis fue de 11.041, de los cuales 98,6% (10.890) corresponden a la forma cutánea, 1,1% (116) a la forma mucocutánea, y el 0,3% (35) a la forma visceral (Boletín notificación obligatoria, SIVIGILA. 2010). Diversos factores pueden ser atribuidos a la constante aparición de casos de LC en el país: en primer lugar, factores sociales tales como: el desplazamiento forzado, el conflicto armado, la deforestación y la expansión de la frontera agraria, los cuales constituyen importantes factores de riesgo para la transmisión de la enfermedad (Vélez *et al.* 2001); en segundo lugar, (quitar coma) está el comportamiento patogénico específico de cada especie de *Leishmania* (Davies *et al.* 2000), y en tercer lugar y tomándose como principal factor de enlace de la triada epidemiológica, está el vector, que varía en: especies, distribución geográfica y comportamiento, de acuerdo al ambiente que habite (Travi *et al.* 1996; Davies *et al.* 2000); este último factor, puede ser influenciado por variables ambientales como la temperatura y precipitación, logrando impactar directamente en la abundancia del vector, y así mismo en la transmisión de la enfermedad (Morrison *et al.* 1995a, Travi *et al.* 1996, González *et al.* 1999, Molina *et al.* 2008).

En general, el país posee condiciones ambientales que favorecen la presencia de especies de *Lutzomyia* como: temperatura ambiental entre 22 y 30º C y el 85% del territorio nacional a una altura entre los 0 a 1.750 msnm (King *et al.*, 2004). Se sabe además, que la distribución geográfica de la enfermedad está limitada por la distribución de los flebótomos vectores y ligada a su comportamiento antropofílico y zoofílico, y la capacidad de permitir el desarrollo interno de especies de *Leishmania*,

prevaleciendo principalmente para Colombia, las cepas que producen las formas patológicas cutánea y mucosa, como *Leishmania (Viannia) panamensis*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) guyanensis* (Grimaldi *et al.* 1989, Saravia *et al.* 2002).

En Colombia se han registrado más de 140 especies de *Lutzomyia* (Montoya y Ferro, 1999, Wolf y Galati, 2002, Bejarano *et al.* 2004, Cabrera *et al.* 2009) que se distribuyen en una gran variedad de hábitats que van desde el desierto al bosque lluvioso y los ambientes antrópicos (Tesh y Guzmán, 1996). Del total de especies existentes, solo se han incriminado como vectores de leishmaniasis cutánea cuatro especies, *L. trapidoi* (Morales *et al.*, 1981), *L. hartmanni* (Kreutzer *et al.* 1991), *L. umbratilis* (Young *et al.* 1987) y *L. spinicrassa* (Young *et al.* 1987). Recientemente se han logrado aproximaciones en la incriminación de las especies *L. panamensis*, *L. gomezi* y *L. yuilli* encontradas naturalmente infectadas con *Leishmania (V.) panamensis* en un foco activo en los municipios de Otanche y Pauna en el departamento de Boyacá (Santamaría *et al.* 2006).

La relación entre vectores y enfermedad se observa frecuentemente en las regiones de la Orinoquía y la Amazonía colombiana, regiones que poseen extensas zonas selváticas, de sabana, morichales, bosques de galería (Mendoza, 2008), y una gran diversidad de especies de *Lutzomyia* 64 % (88 de 140) vectores y no vectores de *Leishmania*. En estas dos regiones divergen de igual forma las diferentes cepas de *Leishmania* del subgénero *Viannia* responsables de los casos de LC, que sumado a factores sociales han favorecido la transmisión del parásito principalmente en ambientes selváticos, evidenciado especialmente en personas pertenecientes a las fuerzas militares y en el aumento de los reportes de casos en los municipios del sur del departamento del Meta, los departamentos de Guaviare, Vaupés, Guainía, Caquetá y Putumayo (Tabla 1).

En la Orinoquía y Amazonía colombiana se han realizado varios estudios encaminados a conocer la diversidad de especies de *Lutzomyia* en algunas áreas de transmisión de la enfermedad. En los departamentos de Casanare y Meta se identificaron principalmente las especies: *L. fairtigi, L. micropyga, L. antunesi*, *L. flaviscutellata, L. panamensis* y *L. gomezi* (Molina *et al.* 2008, Vásquez-Trujillo *et al.* 2008). En estudios realizados en zonas periurbanas, rurales y selváticas del departamento del Amazonas, fueron halladas: *L. davisi, L. chagasi, L. carrerai*, *L. yuilli, L. shawi*, *L. umbratilis* y *L. antunesi* como

posibles responsables de la transmisión del parásito (Ferro *et al.* 1997, Wolff *et al.* 2003). Recientemente en el departamento del Guaviare fueron identificadas como posibles vectores: *L. hirsuta, L. yuilli, L. davisi, L. carrerai, L. antunesi, L. flaviscutellata* y *L. olmeca bicolor* (Cabrera *et al.* 2009).

En el departamento del Meta se han realizado estudios enfocados principalmente a conocer la flebotofauna existente asociada a zonas de transmisión de LC. Se han reportado 35 especies de *Lutzomyia* de las cuales seis tienen antecedentes vectoriales: *L. davisi, L. hirsuta, L. yuilli, L. antunesi, L. gomezi y L. panamensis* (Antunes, 1937; Montoya-Lerma y Ferro, 1998, Barreto *et al.* 2000). En el área rural del municipio de Villavicencio se realizó un estudio entomológico con el fin de conocer las especies de flebótomos que podrían estar involucradas en la transmisión de la LC, esto motivado por la notificación de 13 casos autóctonos en el año 2005, propuso finalmente a *L. antunesi* como probable vector (Vásquez-Trujillo *et al.* 2008); en este estudio se tomaron como criterios para incriminación: la abundancia relativa, el contacto vector-humano, presencia del parásito y de la especie de insecto en la misma zona geográfica, y la identificación del parásito en el insecto y animales domésticos (Killick-Kendrick, 1990; Young y Lewyer, 1987)

A pesar de que estas investigaciones han aportado en el conocimiento sobre fauna de flebótomos existente en la zona, la abundancia e infección natural con *Leishmania*, las variables ambientales y su relación con la abundancia estacional y tasa de infección, aun no han sido estudiadas en el departamento del Meta. Por tal razón, se crea la necesidad de conocer aspectos ecológicos de las especies de *Lutzomyia*, orientado a obtener una mayor comprensión de la eco-epidemiología y con esto, proponer bases estructuradas para la formulación de programas de prevención y control de este tipo de patologías.

Planteamiento del problema

A nivel nacional, el departamento del Meta es la segunda región con mayor incidencia de LC en el país (441,2 casos x 100.000 habitantes, SIVIGILA 2010). A nivel ecorregional (Orinoquía colombiana), el Meta es el departamento de más alta incidencia, superado únicamente por los departamentos pertenecientes a la Amazonía colombiana (Tabla 1). Al sur del departamento del Meta se concentra el 95% de los casos de LC, siendo los municipios de Uribe, La Macarena, Vista Hermosa y Puerto

Concordia los más afectados al presentar incidencias entre 100 a 500 casos x 100.000 habitantes para el 2008 (Oficina de Vigilancia en Salud Publica, Secretaria de Salud Seccional del Meta), ocasionado principalmente al estar involucrados en forma directa en el conflicto armado, además de otros aspectos sociales y biológicos de la zona selvática (Velez *et al*, 2001). Estos municipios aportan para la Orinoquía el 97% de casos de LC, y a nivel nacional el 22% de los cosas de LC aproximadamente desde el año 2005, con un mayor registro de casos en las fuerzas militares nacionales presentes en la selva.

Al norte del departamento del Meta, en el Pidemionte (conformado por los municipios de Guamal, Acacias, Villavicencio, Restrepo y Cumaral), el municipio de Villavicencio es el que más casos de LC aporta, con una incidencia de 0,18 casos x 100.000 habitantes para el año 2005 en la zona rural comprendida por las veredas Apiay, Barcelona, Cocuy y La Reforma (Datos, Oficina de Vigilancia en Salud Publica, Secretaria Seccional de Salud del Meta, 2008). El comportamiento epidemiológico en el municipio ha disminuido en número de casos, pero es estable en la presentación con 1 a 3 casos autóctonos por año hasta el 2010, en el que se presentó un caso en la vereda Barcelona, siendo esta zona la principal área endémica del norte del departamento del Meta.

Tabla 1. Incidencia de leishmaniasis cutánea por entidad territorial, 2010

Departamento	Incidencia x 100.000 hab.
Guaviare*	766,6
Meta	**441,2**
Vaupés*	180,1
Caquetá*	168,7
Antioquia +	168,3
Santander +	145,8
Chocó	135,3
Tolima +	127,8
Caldas +	118,5
Putumayo*	105,2

Diversos factores pueden influir en la constante confirmación de casos de leishmaniasis cutánea en zona rural del municipio de Villavicencio. En primer lugar, están los factores sociales, pues estas zonas presentan un constante patrullaje de soldados y caninos en entrenamiento provenientes de zonas selváticas en donde existe mayor probabilidad de contacto con los vectores, muchos de los casos se asociaron con viviendas precarias y

construidas en zonas ilegales (desplazamiento e invasión de bosques). En segundo lugar está la flebotofauna existente, dominada principalmente por *L. antunesi*, y otras especies consideradas probables vectores como *L. gomezi* y *L. panamensis* (Vasquez-Trujillo *et al.* 2008). Teniendo en cuenta que el vector es el principal eslabón en la transmisión de la LC y que su abundancia puede estar influenciada por factores climáticos, la asociación entre ambos determinará el comportamiento eco-epidemiológico de la enfermedad.

Investigaciones realizadas en Colombia, han encontrado que las especies de *Lutzomyia* presentes en las diferentes regiones del país muestran un comportamiento de variación estacional, aumento en invierno o verano dependiendo de la especie o ninguna variación; manteniendo su abundancia relativamente estables durante todo el año. En zona rural del municipio de Villavicencio durante el año 2005 se realizó un estudio que involucró la búsqueda activa de casos en humanos y caninos, identificando la presencia de *Leishmania* (*V*) *guyanensis* (Vásquez-Trujillo. 2006). Para el año 2006, se realizó un estudio entomológico en la vereda La Reforma con el fin de conocer las especies de flebótomos que podrían estar involucradas en la transmisión de la enfermedad, donde se propuso a *L. antunesi* como posible vector por su abundancia e infección natural con *Leishmania* spp. (Vásquez-Trujillo *et al.* 2008).

Pese a que estas investigaciones han demostrado la presencia de parásitos, especies de vectores y posibles reservorios, aún no se ha realizado ningún estudio para identificar la variación estacional y los factores climáticos que influyen en la abundancia de los vectores y la tasa de infección natural de *Leishmania*, componentes eco-epidemiológicos importantes en la dinámica de transmisión de la enfermedad en la zona.

Teniendo en cuenta tanto el comportamiento endémico de la zona rural del municipio de Villavicencio y la falta de estudios que complementen el conocimiento de la eco-epidemiología de la LC hasta ahora expuesto, se hace necesaria la realización de estudios básicos de abundancia, variación estacional y asociación climática, con el objetivo de entender mejor la dinámica de transmisión de la enfermedad en el nivel local y la identificación de los meses de mayor riesgo de transmisión, información útil

para el desarrollo de programas de prevención, enfocados especialmente en las épocas de mayor riesgo de contacto humano.

Hipótesis

Las poblaciones de *Lutzomyia* del área rural de Villavicencio presentan variación estacional en su abundancia y tasa de infección natural con parásitos del género *Leishmania* spp., y existen variables climáticas asociadas a estos cambios estacionales.

Objetivo general

Determinar la variación estacional en la abundancia e infección con *Leishmania* spp. en especies de *Lutzomyia* spp. presentes en las veredas Barcelona, Cocuy y La Reforma, zona endémica de LC del municipio de Villavicencio.

Objetivos específicos

1. Determinar la variación estacional en la abundancia de las especies de *Lutzomyia* presentes en tres veredas del municipio de Villavicencio.

2. Identificar los determinantes ambientales que influyen en la abundancia estacional de las especies de *Lutzomyia* encontradas.

3. Definir para las especies de *Lutzomyia* spp. con antecedentes vectoriales tasas de infección estacional con *Leishmania* spp y asociación con determinantes ambientales.

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa que afecta a humanos, animales domésticos y silvestres, de distribución cosmopolita (África, Asia, Europa y América), en áreas templadas tropicales y subtropicales, la causa un protozoario difásico del género *Leishmania* transmitido por la picadura de hembras de insectos dípteros hematófagos del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en América, los cuales producen en los humanos lesiones en piel, mucosas o las vísceras (Greene, 1993), en los perros lesiones cutáneas y viscerales y en los animales silvestres pequeñas lesiones o ningún signo aparente (Ashford, 1996).

En función de la localización y características de los reservorios, la transmisión de las diferentes especies de *Leishmania* pueden localizarse en el dosel con las especies *L. (V.) guyanensis, L. (V.) hertigi, L. (V.) panamensis, L. (V.) shawi* o al nivel del suelo con *L. (V.) aristidesi, L. (Leishmania) amazonensis, L. (V.) lainsoni, L. (L.) mexicana, L. (V.) naiffi*. Las especies de *Leishmania* cuyos reservorios son humanos (*L. (L.) donovani, L. (L.) tropica*) o caninos (*L. (V.) peruviana*) que viven en asociación estrecha con el hombre, su modelo de transmisión es peridoméstica, o incluso domestica siguiendo la conducta del vector y su ciclo se localiza en zona rural y urbana (Dedet, 2001).

1.2 Ciclo de vida del parásito

El ciclo inicia cuando los insectos se infectan al ingerir sangre de un hospedador parasitado; la sangre contiene macrófagos o monocitos infectados con las formas amastigotas del género *Leishmania* en el interior de las vacuolas lisosomales (Awasthi *et al.* 2004). En el intestino de los flebótomos, los parásitos completan una compleja serie de transformaciones morfológicas y funcionales que llevan a la diferenciación a promastigotes. Estos maduran a promastigotes metacíclicos o infectivos que al ser incapaces de fijarse a la pared del intestino, se dirigen hacia las regiones bucales donde bloquean la faringe de los flebótomos y son regurgitados en el transcurso de una subsiguiente ingesta sanguínea (Urquhart *et al.* 2001). Los promastigotes que penetran

por la lesión producida durante la picadura son fagocitados por los macrófagos en cuyo interior se transforman en amastigotes y se multiplican cerrando el ciclo (Figura. 1) (De Almedia *et al.* 2003, Awasthi *et al.* 2004). La multiplicación de los parásitos, tanto de los amastigotes como de los promastigotes es por división binaria, al no existir evidencia que compruebe la presencia de estadios de reproducción sexual.

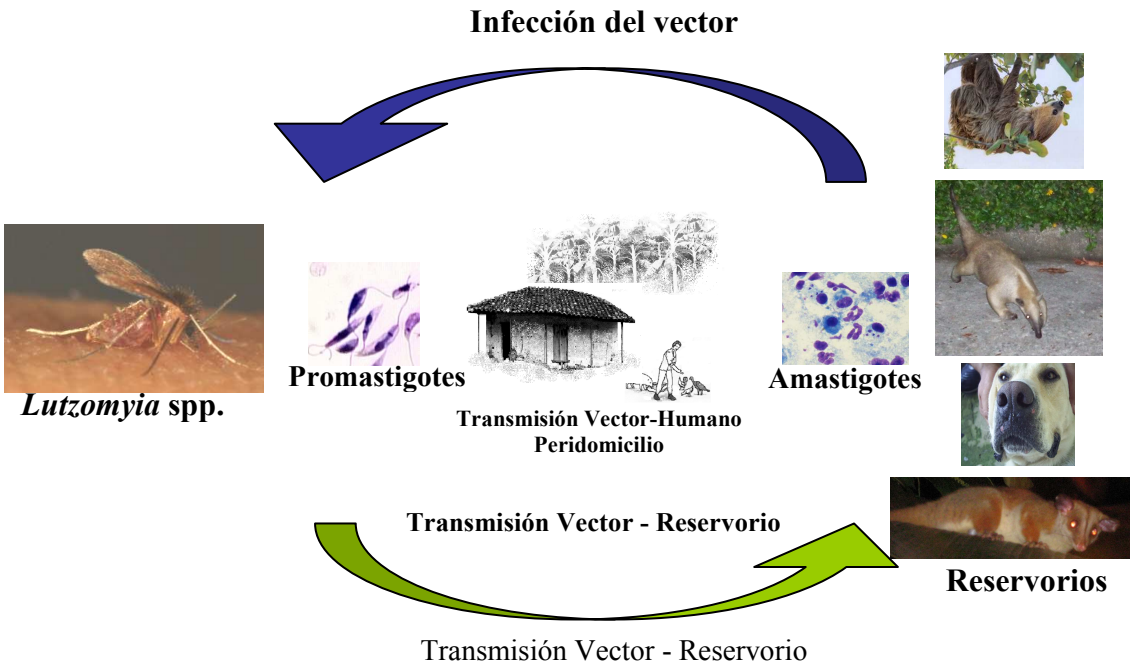


Figura 1. Esquema del ciclo biológico (Imagen *Lutzomyia,* Grupo Entomología, Instituto Nacional de Salud; Imagen promastigotes tomada de http://www.icp.ucl.ac.be**).**

En el ciclo biológico, el parásito es transmitido al hombre y a otros hospederos vertebrados como roedores (*Proechymis semispinosus, Rattus rattus*), marsupiales (*Didelphis marsupialis*) (Reithiger y Davies, 1999), edentados (*Dasypus novemcinctus*, *Myrmecophaga tridactyla* y *Bradypus* y *Choleopus*) (Ashford, 1996), carnívoros silvestres (*Pseudalopex culpaeus*) y domésticos (*Canis lupus familiaris*), que pueden participar como reservorios de la enfermedad en zonas silvestres y rurales (Ferro y Morales, 1998; Ashford, 1996). La identificación de hospederos de *Leishmania* es complicada cuando se vuelve cada vez más claro que el ciclo de transmisión de la enfermedad puede adaptarse a cambios medioambientales (deforestación) y sociales (migración humana) (Ashford, 1996).

1.3 Vectores

Los flebótomos son dípteros pequeños de máximo 5 mm de longitud, se caracterizan por su aspecto hirsuto y largas patas con aspecto de zancos. Las alas, a diferencia de otros dípteros que ingieren sangre, son lanceoladas, están cubiertas por pelo y se mantienen erectas cuando están en reposo. Como en otros dípteros del suborden Nematocera, las partes del aparato bucal son de un tamaño corto o medio, se dirigen hacia abajo y están adaptadas para perforar la piel y aspirar. Los palpos maxilares son relativamente grandes y están formados por cinco segmentos. En ambos sexos las antenas son muy largas, con 16 segmentos y están cubiertas de cortos pelos (Urquhart *et al.* 2001). La identificación de las especies se hace principalmente por morfología interna de la faringe, cibario, espermateca y terminalia masculina (Ferro y Morales, 1998).

Cerca de 800 especies de flebótomos existen en el mundo, y aproximadamente cuarenta son vectores de *Leishmania* (Dedet, 2001). En Colombia se han registrado más de 140 especies de *Lutzomyia* (Montoya y Ferro, 1999; Wolf y Galati, 2002; Bejarano *et al.*. 2004, Cabrera *et al.*, 2009), y ocho especies son relacionadas en los distintos estudios realizados en el país y catalogados como probables vectores al cumplir con algunos criterios de incriminación, *L. panamensis*, *L. gomezi*, *L. flaviscutellata, L. fairtigi, L. longiflocosa, L. yuilli, L. umbratilis* y *L. antunesi* (Travi *et al*. 1988, Ferro *et al.* 1997, Travi *et al*. 2002, Wolff *et al.* 2003, Molina *et al.* 2008, Vásquez-Trujillo *et al.* 2008, Cabrera *et al.* 2009, Marín et al. 2009)

Para lograr la incriminación vectorial de una especie de flebótomo, es necesario cumplir con los siguientes criterios: 1) antropofilia y zoofilia, 2) desarrollo del parásito en el intestino, 3) contacto vector–humano, 4) presencia del parásito y de la especie de insecto en la misma zona geográfica, 5) identificación del parásito aislado del hombre, del insecto y del reservorio en repetidas ocasiones, 6) determinar la capacidad de transmitir el parasito por picadura (Killick-Kendrick, 1990; Young y Lewyer, 1987) y más recientemente se ha incorporado la correlación estadística entre abundancia y distribución de flebótomos, y la incidencia de la enfermedad.

Desde el punto de vista epidemiológico, los criterios 1, 3 y 4 son los más importantes al describir entre ellos la cadena de trasmisión o triada epidémica necesaria para completar

el ciclo, aproximando o postulando especies de *Lutzomyia* como vectores de leishmaniasis. Un buen ejemplo es el estudio realizado en el municipio de Otanche y Pauna, Boyacá, donde se encontró la presencia del parasito en *L. panamensis*, *L. gomezi* y *L. yuilli,* en el humano, características del comportamiento del vector como endofagia y alta abundancia intradomiciliar y peridomiciliar, cumpliendo varios de los criterios de incriminación (Santamaría *et al*. 2006).

Los flebótomos se encuentran ampliamente distribuidos en tres grandes áreas ecológicas: zonas tropicales, subtropicales y mediterráneas (Urquhart, 2001). Estas zonas se pueden resumir a tres hábitats o modelos naturales de infección que corresponden directamente a la ecología de cada paisaje particular. En el Viejo Mundo, el modelo de bosques áridos y semiáridos, correspondientes a las estepas áridas y semiáridas de África del Norte, Asia central y Oriental, y los roedores (*Rattus* spp., *Arvicanthis* spp., *Psammomys* spp., *Meriones* spp.) como principales reservorios y un número de especies de *Leishmania*, pertenecientes principalmente al subgénero *Leishmania*, y en el Nuevo Mundo, en el modelo de bosque selvático se encuentran involucradas todas las especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* excepto *L. peruviana*, especie de importancia médica de los andes peruanos, y como reservorios especies de roedores, edentados y animales domésticos (Dedet, 2001). En los modelos de bosques áridos o semiáridos y selváticos, la infección del hombre resulta de la intromisión al hábitat silvestre (Dedet, 2001).

1.4 Determinantes ambientales de abundancia

Un factor importante en la transmisión de la LC es el comportamiento del vector y el tiempo de actividad de alimentación. Cuando esta actividad ocurre en el peridomicilio hay una alta probabilidad de contacto humano-vector, que por lo general coincide con horas de actividad humana especialmente al anochecer, por ejemplo la actividad de *L. gomezi* en Antioquia y en Miranda, Venezuela está restringida entre las 19:00 y 20:00 horas (Porter y Defoliart, 1981, Feliciangeli, 1997). La restricción de su actividad en el peridomicilio es más pronunciada a mayor altitud principalmente por temperaturas bajas, y a diferencia del extradomicilio (bosques) donde la temperatura es más estable, la actividad de alimentación puede ser constante para las especies que lo habitan, y de

esta manera tener un horario de alimentación hasta horas diurnas y favorecer el aumento de la transmisión de la enfermedad (Davies *et al.*, 2000).

La determinación de factores que afectan la actividad de los vectores, su variación estacional y los determinantes ambientales asociados (temperatura, humedad relativa y precipitación), son una importante herramienta para la comprensión de los mecanismos de transmisión de la enfermedad en una zona ecológica específica. Davies *et al.* (2000) han propuesto que un incremento en la abundancia para muchas especies de flebótomos durante la estación lluviosa puede deberse a un efecto de longevidad debido a este factor en los flebótomos adultos. En bosques de galería en la Orinoquía colombiana, *L. fairtigi* presentó una correlación positiva con la precipitación, temperatura y humedad relativa (Molina *et al.* 2008), por el contrario, en el norte de Venezuela *L. gomezi* y *L. ovallesi* presentaron un aumento en las densidades durante la estación seca y aparecen asociadas a los meses de mayor incidencia de leishmaniasis en un 33,8% y 52,9% para las dos especies respectivamente (Feliciangeli, 1987), y en Brasil, *L. trapidoi* y *L. ylephiletor* mostraron una disminución evidente en sus densidades durante la época de lluvia con respecto a la época seca (Memmott, 1991).

En Colombia el primer estudio de determinación de patrones de abundancia estacional se realizó en *L. longipalpis*, donde se estableció que para dicha especie su mayor abundancia se presenta en las noches más cálidas de los meses lluviosos en Cundinamarca (Morrison *et al.* 1995a), y en zona rural del departamento de Santander los meses de mayor abundancia intradomiciliar de *L. longipalpis* presentaron asociación con el número de hembras infectadas naturalmente (r = 0,645; P = 0,017) (Flórez *et al.* 2006). En la Orinoquía colombiana, el único estudio realizado encontró que la abundancia de *L. fairtigi* tiene correlación positiva con la precipitación en bosques de galería (R^2= 0,675; P= 0,001) (Molina *et al.* 2008).

Por tanto, la precipitación, temperatura y humedad relativa son los principales factores ambientales determinantes de los modelos estacionales de abundancia, afectando tanto la actividad del vector como su abundancia y por consiguiente ser determinantes en dinámica de transmisión de la enfermedad.

1.4.1 Temperatura

La temperatura ambiental es un determinante relacionado principalmente con la actividad nocturna diaria de algunas especies de *Lutzomyia*. En Colombia, machos y hembras de *L. longipalpis* exhibieron una correlación positiva en la disminución de su actividad nocturna a temperaturas menores o iguales a 24° C (Morrison *et al.* 1995a), y en cuanto a su variación estacional mensual, la temperatura mostró una asociación negativa (r = -0,3) con las densidades (Morrison *et al.* 1995b). En otras regiones de Colombia (Orinoquía), estudios realizados por Molina *et al.* (2008) en bosques de galería, la abundancia de *L. fairtigi* tuvo una correlación positiva con la temperatura presentando un coeficiente de determinación R^2 = 0,6 (P= 0,003), y estudios realizados por Carvajal (2008) en el departamento del Huila demostraron que para *L. longiflocosa* el principal determinante ambiental que explica la abundancia estacional es la temperatura con un coeficiente de correlación r = 0,43. Por otra parte, en Brasil, *L. intermedia* presentó una asociación positiva con la temperatura máxima (R^2= 0,77) y temperatura minima (R^2= 0,747) y *L. whitmani* una relación inversa con la temperatura minima (R^2= - 0,708) para la abundancia estacional de ambas especies (Souza *et al.* 2002).

1.4.2 Precipitación

La fluctuación en la actividad y abundancia de especies de *Lutzomyia* en una zona endémica para leishmaniasis visceral y cutánea con el aumento de la lluvia señalan que este es un factor crítico para dicho género de insectos. En Costa Rica, la abundancia de *L. trapidoi* y *L. ylephiletor* fue afectada significativamente durante la estación lluviosa en seguimientos realizados en zonas selváticas (Memmott, 1991), en bosques de la Guyana francesa, hembras de *L. umbratilis* presentaron una clara disminución en las densidades con el aumento de la lluvia en capturas con trampa CDC a un metro de altura (Le Pont y Pajot, 1977). En forma contraria en el norte de Venezuela las densidades de *L. panamensis* presentaron un importante aumento con la lluvia (González *et al.* 1999).

Estudios realizados por Feliciangeli y Rabinovich (1998) demostraron que *L. ovallesi* tiene una correlación significativa con la precipitación (r = 0,47), y que *L. gomezi*

además de tener correlación positiva (r = 0,5) con la precipitación, esta correlacionada con la incidencia de la LC en Venezuela (r = 0,98), en Brasil, investigaciones adelantadas por Souza *et al.*, (2002) demostraron que *L. whitmani* presentó una asociación negativa con la precipitación (R^2= - 0,706) en zonas boscosas.

En Colombia, las densidades de *L. longipalpis* presentaron promedios de captura de 7,6 ejemplares/recolector durante la temporada seca y 1,7 ejemplares/recolector durante la temporada de lluvia (Morrison *et al.* 1995a). En la región Atlántica, *L. evansi* mostró un gran aumento en las densidades al final de la época lluviosa y una disminución gradual al final de la estación seca (Travi *et al.* 1996), y en el departamento de Casanare *L. fairtigi* presentó una correlación positiva con la precipitación (R^2= 0,675; P= 0,001) (Molina *et al.* 2008).

1.4.3 Humedad relativa

Aunque la temperatura y precitación son determinates explicativos de abundancia estacional de gran peso, la humedad relativa en algunos estudios presenta una asociación importante con la actividad nocturna de los flebótomos. Por ejemplo, *L. longipalpis* presenta una correlación positiva entre porcentajes de humedad superiores al 80% y el aumento de su actividad nocturna (tasa de picadura) (Morrison *et al.* 1995a), sin ningún efecto en la variación estacional (r = 0,3) (Morrison *et al.* 1995b). Por otra parte, en el departamento de Casanare, *L. fairtigi* presentó una correlación positiva entre la humedad relativa y la variación mensual de las densidades de dicha especie explicado con un R^2= 0,652 (P = 0,002) (Molina *et al.*, 2008).

1.5 Detección de infección natural

Un factor necesario en la transmisión de la LC es la identificación de infección natural con *Leishmania* spp. en especies de *Lutzomyia*. El método tradicional para detectar infección natural involucra la disección de las hembras recolectadas una por una y el uso de medios de cultivos para los parásitos hallados. Las primeras investigaciones orientadas a determinar infección natural en flagelados, se realizaron en hembras disecadas de *L. longipalpis* utilizando isoenzimas como herramienta diagnostica (Le Pont y Desjeux, 1985), técnica que se utilizó ampliamente y ayudo a identificar los

ciclos de transmisión y los principales reservorios de la enfermedad (Braga *et al.*, 1986), a la incriminación de vectores (Travi *et al.*, 1990; Rowton *et al.*, 1992) e identificación de nuevas especies de *Leishmania* en humanos, reservorios y vectores (Kreutzer *et al.*, 1991).

La utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y marcadores moleculares específicos han ayudado a que el proceso de identificación de infección natural sea más practico; con esta metodología se ha identificar la variación en las tasas de infección natural con *Leishmania* en las poblaciones de *Lutzomyia*, así como identificar zonas de mayor riesgo de transmisión (intra, peri y extradomicilio) (Kato *et al.* 2005, Flórez *et al.* 2006, Marín *et al.* 2009).

En Colombia, la utilización de la PCR en investigaciones de infección de flebótomos es relativamente reciente, el primer trabajo realizado fue la estandarización de un protocolo de extracción y amplificación de ADN con los iniciadores OL1 y OL2 (Cabrera *et al.*, 2003), luego se paso a realizar estudios en campo utilizando los iniciadores reportados por Bruijn y Barker (1992) y Mimori *et al.* (2002) logrando identificar infección natural en las especies *L. panamensis*, *L. gomezi* y *L. yuilli* con *Leishmania (V) panamensis* (Santamaría *et al.* 2006). En el departamento de Santander y Meta se identificó infección natural con *Leishmania* spp. utilizando los iniciadores OL1 y OL2 en *L. longipalpis* y *L. antunesi* respectivamente (Flórez *et al.* 2006, Vasquez-Trujillo *et al.* 2008), y el reporte más reciente es la identificación de *Leishmania Viannia* en ejemplares de *L. longiflocosa* en zona rural del municipio de Chaparral, Tolima, utilizando PCR- Southern blot (Marin *et al.* 2009).

En general, el empleo de la PCR ha permitido realizar estudios de epidemiología molecular (Rotureau *et al.* 2006, Miranda *et al.* 2009), mapas de distribución geográfica de parásitos (Saravia *et al.* 1998, Ovalle *et al.* 2006), identificación de vectores en zonas endémicas (Santamaría *et al.* 2006, Vásquez-Trujillo *et al.* 2008), y estudios de caracterización de zonas de transmisión así como épocas en las que se evidencia mayor tasa de infección natural en vectores (Flórez *et al.* 2006, Marín *et al.* 2009).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el municipio de Villavicencio ubicado al norte del departamento del Meta, subregión Piedemonte Llanero perteneciente a la ecorregión de la Orinoquía colombiana. El muestreo se realizó en tres veredas, La Reforma (04,04581 LN, 73,28348 OL), Barcelona (04,03905 LN, 73,35680 OL) y Cocuy (04,02494 LN, 73,36136 OL), ubicadas a una distancia de 12, 4 y 7 km de Villavicencio respectivamente., la zona de estudio está caracterizada como bosque tropical húmedo premontano con algunos elementos de bosque tropical húmedo (Holdrige, 1967). Esta zona está ubicada a 380 msnm, con temperatura promedio de 25 °C, humedad relativa de 85% y una precipitación anual de 3600 mm (Instituto de hidrología, meteorología y estudios ambientales - IDEAM)

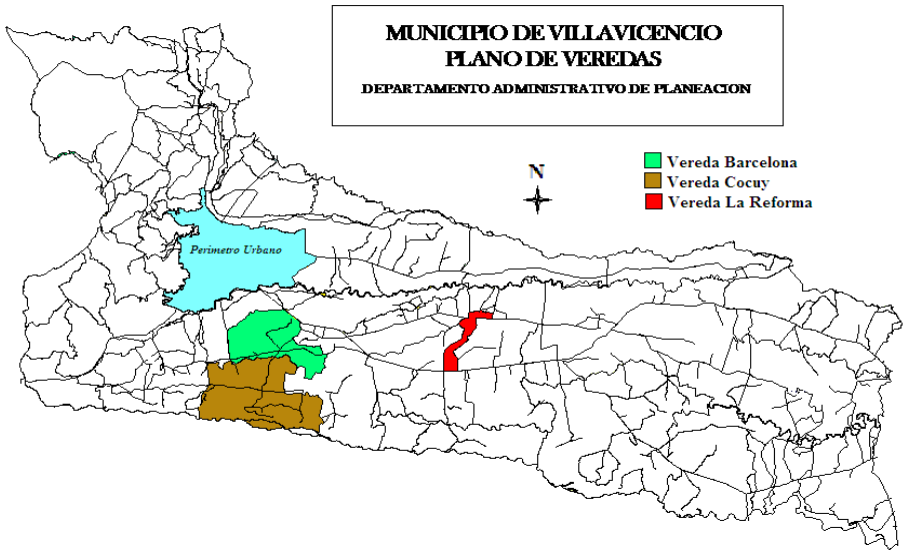


Figura 2. Mapa del Municipio de Villavicencio, veredas de estudio.

2.2 Muestreo línea base

Se realizó un muestreo en la totalidad de las viviendas de las veredas La Reforma, Barcelona y Cocuy, con el fin de establecer la composición de especies de *Lutzomyia* presentes en las tres veredas de Villavicencio, y determinar las viviendas con mayor abundancia peridomiciliar de flebótomos como unidad de seguimiento mensual. Se

realizo un único muestreo por vivienda utilizando trampas de luz tipo CDC a 1,5 m de altura y a 15 m de distancia de la vivienda, entre las 18:00 y 06:00 horas. Los flebótomos recolectados se trasladaron al Laboratorio de Entomología de la Secretaria de Salud Departamental en la ciudad de Villavicencio, sacrificados a 0° y almacenados en tubos eppendorf con etanol al 70% a una temperatura de 4º C hasta su identificación taxonómica. En total se muestrearon 147 viviendas, y solo se seleccionaron las viviendas que obtuvieron capturas superiores a 1000 ejemplares de *Lutzomyia* por trampa/noche.

En el presente estudio, el peridomicilio corresponde a las áreas abiertas de las viviendas, donde las personas realizan sus actividades domésticas, como solares, cobertizos de animales, patios, sitio para ver televisión, etc. aproximadamente hasta 15 m de la vivienda.

2.3 Muestreo estacional

Se seleccionaron tres viviendas con el criterio inicial de abundancia, una en la vereda Barcelona con 4.356 *Lutzomyia* por trampa/noche, una en la vereda Cocuy con 3.413 *Lutzomyia* por trampa/noche y otra en la vereda La Reforma con 1.034 *Lutzomyia* por trampa/noche. Adicional, las tres viviendas cumplieron con otros criterios de selección como: 1) estar a una distancia minima de 200 m a un bosque, 2) registro reciente de casos confirmados de leishmaniasis cutánea tanto en humanos como en caninos en ellas o en casas vecinas y 3) contar con la autorización de los habitantes de la vivienda.

En las tres viviendas de cada vereda con mayor abundancia se realizó el muestreo en los ambientes; 1) intradomicilio, corresponde al interior de la vivienda, limitado por el entorno de las paredes, 2) peridomicilio, como se defino en el muestro línea base y 3) extradomicilio, correspondiente a los bosques aledaños a las casas ubicados a una distancia mínima de 200 m. Se realizó una recolección de insectos durante tres días consecutivos cada mes, por doce meses, en las tres veredas simultáneamente. El muestreo se realizó de junio de 2008 a mayo de 2009.

2.3.1 Variables explicatorias de abundancia de *Lutzomyia*

Se tomaron 40 variables climáticas explicatorias de abundancia de especies de *Lutzomyia* (Tabla 2). Para cada una de las variables se tomaron los datos del día del muestreo, y los datos de las 24 horas, 48 horas y 15 días antes del muestreo con el fin de evaluar si estas tienen alguna relación con el aumento o disminución en la abundancia de especies de *Lutzomyia*.

2.3.2 Variables fisiológicas

Durante la identificación entomológica de hembras de *Lutzomyia*, se realizaron observaciones de algunas características fisiológicas como alimentación y desarrollo de huevos. Las variables observadas fueron: 1) presencia de sangre fresca (sangre de color rojo claro), 2) presencia de sangre digerida (sangre de color marrón), 3) presencia de huevos (huevos de IV o V estadio), y 4) presencia de sangre y huevos (sangre fresca o digerida y huevos de IV o V estadio).

Tabla 2. Variables independientes que podrían explicar la abundancia de insectos del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio

Variable independiente	Definición	Categoría
Registro estación IDEAM 2008 – 2009		
Precipitación día	Precipitación del día en que se realizó el muestreo para cada uno de los puntos de recolección de datos y en cada vereda.	Cuantitativa continua
Precipitación <24 h	Precipitación 24 horas antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
Precipitación <48 h	Precipitación 48 horas antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
Precipitación <15 días	Precipitación 15 días antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
HR % día	Humedad relativa del día en que se realizó el muestreo para cada uno de los puntos de recolección de datos y en cada vereda.	Cuantitativa continua
HR % <24h	Humedad relativa 24 horas antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
HR % <48h	Humedad relativa 48 horas antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
HR % <15 días	Humedad relativa 15 días antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
BS Horas día	Horas de brillo solar del día en que se realizó el muestreo para cada uno de los puntos de recolección de datos y en cada vereda.	Cuantitativa continua
BS Horas <24 h	Horas de brillo solar 24 horas antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
BS Horas <48 h	Horas de brillo solar 48 horas antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
BS Horas <15 días	Horas de brillo solar 15 días antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
Evap mm día	Milímetros de evaporación del día en que se realizó el muestreo para cada uno de los puntos de recolección de datos y en cada vereda.	Cuantitativa continua
Evap mm <24H	Milímetros de evaporación 24 horas antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
Evap mm <48H	Milímetros de evaporación 48 horas antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
Evap mm <15D	Milímetros de evaporación 15 días antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
V/viento Med m/s día	Velocidad del viento media del día en que se realizó el muestreo para cada uno de los puntos de recolección de datos y en cada vereda, unidad metros/segundo	Cuantitativa continua
V/viento Med m/s <24 h	Velocidad del viento media 24 horas antes del día en que se realizó el muestreo, unidad metros/segundo	Cuantitativa continua
V/viento Med m/s <48 h	Velocidad del viento media 48 horas antes del día en que se realizó el muestreo, unidad metros/segundo	Cuantitativa continua
V/viento Med m/s <15 días	Velocidad del viento media 15 días antes del día en que se realizó el muestreo, unidad metros/segundo	Cuantitativa continua

Tabla 2. Continuación

Variable independientes	Definición	Categoría
V/viento Max m/s día	Velocidad del viento máxima del día en que se realizó el muestreo para cada uno de los puntos de recolección de datos y en cada vereda, unidad metros/segundo	Cuantitativa continua
V/viento Max m/s <24 h	Velocidad del viento máxima 24 horas antes del día en que se realizó el muestreo, unidad metros/segundo	Cuantitativa continua
V/viento Max m/s <48 h	Velocidad del viento máxima 48 horas antes del día en que se realizó el muestreo, unidad metros/segundo	Cuantitativa continua
V/viento Max m/s <15 días	Velocidad del viento máxima 15 días antes del día en que se realizó el muestreo, unidad metros/segundo	Cuantitativa continua
Temp Media ℃ día	Temperatura media del día en que se realizó el muestreo para cada uno de los puntos de recolección de datos y en cada vereda.	Cuantitativa continua
Temp Media ℃ <24 h	Temperatura media 24 horas ant es del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
Temp Media ℃ <48 h	Temperatura media 48 horas ante s del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
Temp Media ℃ <15 días	Temperatura media 15 días a ntes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
Temp Max ℃ día	Temperatura máxima del día en que se realizó el muestreo para cada uno de los puntos de recolección de datos y en cada vereda.	Cuantitativa continua
Temp Max ℃ <24 h	Temperatura máxima 24 horas antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
Temp Max ℃ <48 h	Temperatura máxima 48 horas ante s del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
Temp Max ℃ <15 días	Temperatura máxima 15 días an tes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
Temp Min ℃ día	Temperatura minima del día en que se realizó el muestreo para cada uno de los puntos de recolección de datos y en cada vereda.	Cuantitativa continua
Temp Min ℃ <24 h	Temperatura minima 24 horas antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
Temp Min ℃ <48 h	Temperatura minima 48 horas antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
Temp Min ℃ <15 días	Temperatura minima 15 días antes del día en que se realizó el muestreo	Cuantitativa continua
Número de días de lluvia	Numero de días en los que se presentó lluvia sin importar su intensidad	Cuantitativa continua

Tabla 3. Variables dependientes, abundancia de insectos del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio

Variable dependientes	Definición	Categoría
Muestreo realizado con trampa CDC de Luz.		
Total *Lutzomyia*	Total de ejemplares de *Lutzomyia* spp. recolectados durante los tres días de captura, en las tres veredas y en los tres hábitats (intradomicilio, peridomicilio y extradomicilio).	Cuantitativa discreta
Total intradomicilio	Total de ejemplares de *Lutzomyia* recolectados en el intradomicilio durante los tres días de captura y en las tres veredas.	Cuantitativa discreta
Total peridomicilio	Total de ejemplares de *Lutzomyia* recolectados en el peridomicilio durante los tres días de captura y en las tres veredas.	Cuantitativa discreta
Total extradomicilio	Total de ejemplares de *Lutzomyia* recolectados en el extradomicilio durante los tres días de captura y en las tres veredas.	Cuantitativa discreta
L. antunesi total	Total de ejemplares de *L. antunesi* recolectados durante los tres días de captura, en las tres veredas y en los tres hábitats (intradomicilio, peridomicilio y extradomicilio).	Cuantitativa discreta
L. antunesi intradomicilio	Total de ejemplares de *L. antunesi* recolectados en el intradomicilio durante los tres días de captura y en las tres veredas.	Cuantitativa discreta
L. antunesi peridomicilio	Total de ejemplares de *L. antunesi* recolectados en el peridomicilio durante los tres días de captura y en las tres veredas.	Cuantitativa discreta
L. antunesi extradomicilio	Total de ejemplares de *L. antunesi* recolectados en el extradomicilio durante los tres días de captura y en las tres veredas.	Cuantitativa discreta
L. flaviscutellata	Total de ejemplares de *L. flaviscutellata* recolectados durante los tres días de captura, en las tres veredas y en los tres hábitats (intradomicilio, peridomicilio y extradomicilio).	Cuantitativa discreta
L. flavis. peridomicilio	Total de ejemplares de *L. flaviscutellata* recolectados en el peridomicilio durante los tres días de captura y en las tres veredas.	Cuantitativa discreta
L. flavis. extradomicilio	Total de ejemplares de *L. flaviscutellata* recolectados en el extradomicilio durante los tres días de captura y en las tres veredas.	Cuantitativa discreta

Tabla 3. Continuación

Variable dependientes	Definición	Categoría
Muestreo realizado con trampa CDC de Luz.		
L. panamensis	Total de ejemplares de *L. panamensis* recolectados durante los tres días de captura, en las tres veredas y en los tres hábitats (intradomicilio, peridomicilio y extradomicilio).	Cuantitativa discreta
L. pana. intradomicilio	Total de ejemplares de *L. panamensis* recolectados en el intradomicilio durante los tres días de captura y en las tres veredas.	Cuantitativa discreta
L. pana peridomicilio	Total de ejemplares de *L. panamensis* recolectados en el peridomicilio durante los tres días de captura y en las tres veredas.	Cuantitativa discreta
L. pana. extradomicilio	Total de ejemplares de *L. panamensis* recolectados en el extradomicilio durante los tres días de captura y en las tres veredas.	Cuantitativa discreta
L. gomezi	Total de ejemplares de *L. gomezi* recolectados durante los tres días de captura, en las tres veredas y en los tres hábitats (intradomicilio, peridomicilio y extradomicilio).	Cuantitativa discreta
L. gomezi intradomicilio	Total de ejemplares de *L. gomezi* recolectados en el intradomicilio durante los tres días de captura y en las tres veredas.	Cuantitativa discreta
L. gomezi peridomicilio	Total de ejemplares de *L. gomezi* recolectados en el peridomicilio durante los tres días de captura y en las tres veredas.	Cuantitativa discreta
L. gomezi extradomicilio	Total de ejemplares de *L. gomezi* recolectados en el extradomicilio durante los tres días de captura y en las tres veredas.	Cuantitativa discreta

2.4 Determinación de infección natural

La determinación de tasa de infección con *Leishmania* spp. solo se realizó en las especies de *Lutzomyia* con antecedentes vectoriales. Para tal fin se utilizó la técnica de PCR siguiendo los protocolos estandarizados en el Instituto Nacional de Salud (INS) (Cabrera *et al.*, 2002; Santamaría *et al.*, 2006) y se utilizó los iniciadores universales específicos para el género *Leishmania* OL1 y OL2 (Romero *et al.*, 2001).

Especie	Iniciador hacia adelante	Iniciador reverso	Peso de banda	Referencia
Leishmania	OL1: 5´-GGG GAG GGG CGT TCT GCG AA-3´	OL2: 5´-CCG CCC CTA TTT TAC ACC AAC CCC-3´	≈120 pb	Romero *et al.*, 2001

Se realizó un corte en el insecto separando abdomen de tórax y cabeza, en busca de obtener únicamente las formas infectivas en vías digestivas superiores; de esta manera lograr procesar flebótomos en los cuales, el desarrollo esperado de la *Leishmania* se encuentre en una fase infectiva en el vector superior a siete días, representado gráficamente en la Figura 3, C.

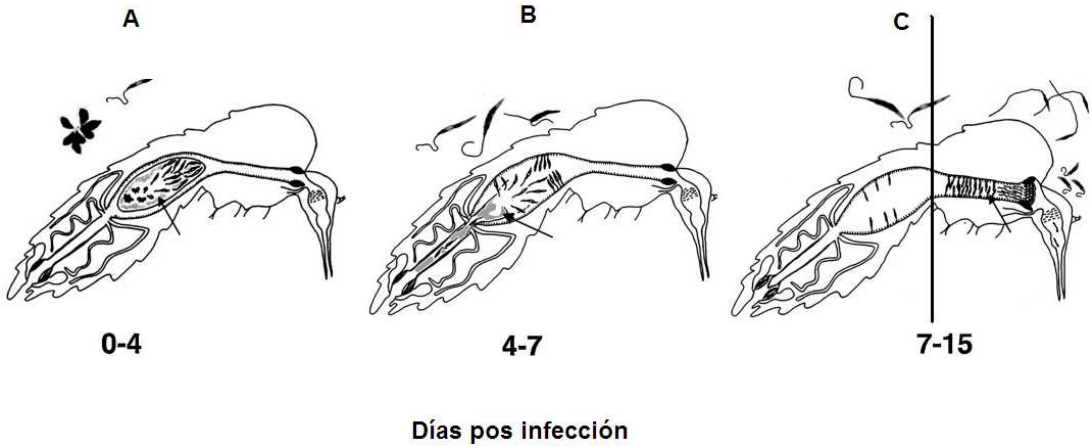


Figure 3. Etapas en el desarrollo de la infección por *Leishmania* en *Lutzomyia*, aparición secuencial de formas morfológicas de promastigotes y su ubicación en los diferentes aspectos del intestino (Sacks y Kamhawi, 2001)

2.4.1 Protocolo de extracción de ADN de ejemplares de *Lutzomyia*.

Se realizó la extracción de ADN utilizando el protocolo de fenol-cloroformo propuesto por Golczer y Arrivillaga (2008), en el cual se utiliza una tampón de lisis celular el siguiente compuesto conformado por soluciones de NaCl 0,1 M; sacarosa 0,2 M; EDTA 50 mM; tris-HCl 100 mM pH 8,25; SDS 0,05 %, y como proteolítico la enzima proteinasa K.

2.4.3 Valoración de la sensibilidad de la prueba al número máximo de *Lutzomyia* por grupo y validación de la PCR con iniciadores OL1 y OL2

Para estandarizar el número de flebótomos a procesar sin alterar la sensibilidad de la prueba por inhibición (Aransay *et al*. 2000), se tomaron números crecientes a partir del estándar determinado anteriormente en el Grupo de Entomología del INS, en el cual, el número máximo de insectos a procesar fue de 3 ejemplares de *Lutzomyia* por grupo (Vásquez y González, 2006).

Los grupos quedaron conformados por 1, 3, 6, 9, 12, 15 y 30 ejemplares de *L. longipalpis*, cada uno de los grupos contó con un ejemplar teóricamente infectado, es decir, a cada grupo de hembras de *L. longipalpis* (1, 3, 6, 9, 12, 15 y 30) se adicionó una suspensión que contenía 10 promastigotes de *Leishmania chagasi* en 10µl de etanol al 96%, como número mínimo de parásitos presentes en una hembra infectada por grupo. La cantidad de promastigotes propuesta se tomó de acuerdo a los resultados obtenidos en infecciones experimentales para las especies *L. evansi, L. longipalpis, L. trapidoi, L. gomezi* y *L. intermedia* (Rangel *et al.* 1993, Jaramillo *et al.* 1994, Montoya-Lerma *et al.* 2003). Cada grupo se comparó con un control positivo, determinado por un tubo con 10 promastigotes de *Leishmania chagasi* en 10µl de etanol al 96%, el control negativo fue ADN obtenido de tres hembras de *L. longipalpis* de 1 a 3 días de nacidas sin suministro de alimento.

Para obtener la solución de parásitos deseada, se preparó una solución 1:20 de un tubo de cultivo *L. chagasi* en medio Schneider enriquecido, se determinó el recuento de parásitos en esta dilución utilizando la siguiente formula: No de células x 10 x 20/4; donde 10 es el factor que transforma la superficie de mm^2 a volumen en mm^3, 20 es el

factor de dilución usado y 4 es el número de cuadrantes para el recuento en la cámara de Newbauer (Santamaría, 2004).

2.4.4 Validación de los iniciadores OL1 y OL2

Con el fin de demostrar la repetibilidad y reproducibilidad de la técnica estandarizada de PCR para los iniciadores OL1 y OL2 la cual se desarrolló en el grupo de Entomología del INS, se diseño un ensayo de determinación de prevalencia esperada utilizando como población el número de grupos obtenidos con base a los resultados del ensayo de pérdida de la sensibilidad y la determinación del número máximo por grup, bajo distintas condiciones ambientales, equipos y reactivos de diferente proveedor. Para realizar la validación, se asumió en este caso que no sabemos, cuál es la prevalencia y se asumió que, si repitiéramos esta PCR muchas veces, la prevalencia puede estar entre 0 y 3,5% con un promedio de 1,5%. Para determinar el número de muestras a procesar del total de muestras obtenidas, se utilizó la siguiente formula de estimación de tamaño de muestra por prevalencia en un conjunto finito:

$$n \leq \frac{N * Z_{\alpha}^{2} * p * q}{d^{2} * (N-1) + Z_{\alpha}^{2} * p * q}$$

donde: N = total de la población
Z_{α}^{2} = 1.962 (con un nivel de confianza del 95%)
p = proporción esperada (en este caso 1.5% = 0.015)
q = 1–p (en este caso 1-0.015 = 0.985)
d = precisión o error (en este caso aceptamos un 0.02).

$$n \leq \frac{711 * 1{,}96^{2} * 0{,}015 * 0{,}985}{0{,}02^{2} * (711-1) + 1{,}96^{2} * 0{,}015 * 0{,}985}$$

$$n \leq 118$$

Entonces para la validación se repitió la PCR por lo menos en 118 muestras escogidas aleatoriamente.

2.5 Determinación taxonómica

2.5.1 Machos y hembras no procesados) por PCR

Se realizó el tratamiento de aclaración para su identificación taxonómica de acuerdo con la metodología reportada por Maroli *et al.*, (1997), la cual establece los siguientes pasos: aclaración en una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10% durante 12 horas,

después tres lavados en etanol al 70% y finalmente adición de fenol (Merck) al 95% para aclarar tejidos y permitir la visualización de las estructuras diagnósticas para su identificación.

Algunos ejemplares fueron seleccionados para montajes permanentes en bálsamo de Canadá (Carlo Erba) y fenol en una proporción 1:1. El insecto aclarado se trasladó sobre una lámina portaobjetos, donde se realizó un corte de la cabeza para visualizar estructuras de la faringe y antenas. Después de dejar secar, por lo menos durante 3 días, se agregó una gota de la solución (bálsamo: fenol) en proporción 1:1 y se dejó caer suavemente una laminilla cubreobjetos.

La identificación de los machos y hembras, se realizó bajo un microscopio de luz (Olympus CX31), siguiendo las claves taxonómicas de Young y Duncan (1994), y se observaron principalmente los palpómeros, la pigmentación de scutum, las coxas, y las características de la terminalia.

2.5.2 Determinación taxonómica de las hembras procesadas por PCR

Los especimenes hembras de *Lutzomyia* se conservaron a una temperatura de 4º C en tubos eppendorf con etanol al 70%. Para su determinación taxonómica, se separaron bajo un estereoscopio de luz fría donde se observó principalmente características como: longitud del quinto palpo, pigmentación del scutum, longitud de los flagelómeros y de las venas alfa y beta en las alas, estructuras importantes para la aproximación taxonómica, de acuerdo con las claves de Young y Duncan (1994).

2.5.3 Características generales de cada Subgénero, Grupo o especie

Subgenero *Nyssomyia*. Palpómero 5 más corto que la combinación de la longitud de los palpómeros 3 + 4, cibarium con 6 o más dientes horizontales. Ascoides antenales simples.

- *L. flaviscutellata*. Scutum bicoloreado, pronotum fuertemente pigmentado, cibarium con 6 o 7 dientes horizontales

- *L. antunesi*. Scutum no bicoloreado, espermatecas con menos de 8 anillos, su longitud es cerca de la mitad de la longitud del ducto espermático individual.

Subgénero Psychodopygus. Palpómero 5 más corto que la mitad de la longitud del palpómero 3, espermatecas imbricadas.

- *L. panamensis*. Scutum suavemente pigmentado, espermatecas con anillos simétricos terminales.

- *L. fairtigi, L. chagasi.* Scutum bien pigmentado, ducto espermático común con paredes lisas, ductos individuales en parte con espigas (patrones de rugosidad).

Subgénero *Sciopemyia*. Palpómero 5 subigual o más corto que los palpómeros 3 + 4, flagelomero I muy largo mínimo dos veces la longitud del labrum.

- *L. sordelli*. Espermatecas con ductos individuales anchos y más largos que 4,5 veces la longitud de las espermatecas.

- *L. preclara*. Espermatecas con ductos individuales delgados y más cortos que 4,5 veces la longitud de las espermatecas

- *L. nematoducta*. Espermatecas con ductos individuales muy largos, más anchos en la unión con el ducto común.

Grupo *Migonei*

- *L. walkeri*. Palpómero 5 más largo que la combinación de los palpómeros 3 + 4. Scutum y pleura ligeramente pigmentados. Espermatecas con ductos más delgados, aproximadamente un tercio del ancho del ducto común.

Subgénero *Lutzomyia*

- *L. gomezi*. Pleura completamente pálida, scutum bien pigmentado, cabeza con al menos una franja de pigmentación y labrum > 0,25 mm. Palpómero 5 más largo que la combinación de los palpómeros 3 + 4. Espermatecas con ductos individuales relativamente delgados.

2.5.4 Control de calidad de la identificación de especies

- Después de haber agrupado las hembras por especie, identificadas con características externas tales como los palpos, la pigmentación del scutum y las coxas, se tomó una submuestra (10%) de las hembras de cada grupo para confirmar la identificación por medio de las espermatecas, principal estructura diagnóstica para hembras de este género.
- El ejemplar fue depositado en una lámina portaobjetos, donde se removieron los últimos tres segmentos del abdomen con la ayuda de un par de agujas entomológicas, luego se cubrió con una lámina pequeña y se adicionó fenol.

- Se observó al microscopio para identificar las estructuras, características para cada especie, a los montaje se le adicionó bálsamo de Canadá: fenol (1:1) para preservarlos.

2.6 Análisis estadístico

2.6.1 Variación estacional y determinantes ambientales

Los datos ambientales, temperatura diaria máxima, minima y media, precipitación diaria máxima, minima y media, humedad relativa diaria, horas de brillo solar, milímetros de evaporación, velocidad del viento media y máxima y dirección del viento, fueron donados por el IDEAM, Estación Unillanos, código: 3503507, tipo Climática principal. latitud 04,04 N, longitud 73,34 W, elevación 340 msnm, ubicada en la vereda Barcelona.

Inicialmente los datos se organizaron en tablas de frecuencias y posteriormente con representaciones gráficas, diagramas de barras e histogramas de frecuencias. Se realizó una primera aproximación a los datos recolectados a través de parámetros estadísticos descriptivos, de posición, dispersión y asimetría. Para determinar la variación estacional en la abundancia de las especies del género *Lutzomyia* presentes en el área de estudio, se realizaron pruebas de supuestos paramétricos de Shaphiro-Wilk, y posterior a esto, se realizó una transformación de los datos que no presentaron distribución normal a su logaritmo natural (logn (y+1)), y luego, se realizó el análisis de varianza de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para comprobar la independencia entre las variables climáticas y pruebas de normalidad de Shaphiro-Wilk tanto a las variables climáticas normales como las transformadas que no presentaron distribución normal. Para determinar en qué proporción afectan las variables climáticas a los recuentos de las especies de insectos capturados, se determinó el coeficiente de correlación de Pearson únicamente a las variables que presentaron distribución normal y posteriormente se realizó regresión lineal a las variables con correlación significativa ($P<0,05$), con el fin de determinar qué porcentaje de la variabilidad es explicado por el modelo lineal y si la cantidad de información dada por la variable independiente es

significativa; para las variables de abundancia y clima no paramétricas, se realizó una prueba de correlación de Spearman.

2.6.2 Asociación entre variables fisiológicas y tasa de infección natural con determinantes ambientales

Para determinar la tasa de infección mensual (TIM), se utilizo la formula TIM=(TP/TL), donde TP es el número total de grupos positivos por PCR en el total o por especie de flebótomos capturados, y TL es el total de grupos procesados o por especies. Para determinar la asociación o independencia entre determinantes ambientales y la presencia de hembras con sangre fresca, con huevos o positivas por PCR, se realizó una prueba de correlación de rangos de Spearman entre determinantes ambientales y variables fisiológicas (hembras con sangre o no, con huevos o no, infectadas o no) en proporciones. Después de identificar las variables con correlación significativa ($P<0,05$), se realizaron cohortes arbitrarias al convertir las variables ambientales en variables binarias (precipitación <24 h (>5=1 <5=0); precipitación <48 h (>5=1 <5=0); temperatura máxima °C <15D (>30.5=1 <30.5=0), seguido se realizaron tablas de contingencia 2 x 2, pruebas de Chi^2 y determinación del OR, con un nivel de confianza del 95%. Se propuso realizar las pruebas de asociación o independencia a la especie más abundante en las tres zonas de muestreo o que presentaran tasas de infección natural constantes durante el año.

3. RESULTADOS

3.1 Muestreo línea base

La especie más abundante fue *L. antunesi* con un 63,0% en Barcelona, 86% en Cocuy y un 93,3% en La Reforma. En forma general las especies que le siguieron en abundancia fueron *L. walkeri, L. gomezi* y *L. panamensis* con un 24,4%, 1% y 0,7% respectivamente (Tabla 4).

3.2 Determinación de variación estacional de especies de *Lutzomyia* en el área endémica.

3.2.1 Composición de especies para cada zona de muestreo

La riqueza para cada hábitat de muestreo fue diferente durante los doce meses de estudio, en el intradomicilio se identificaron siete especies de *Lutzomyia*, siendo la más abundante *L. antunesi* (85,9%) seguida de *L. walkeri* (8,2%) y *L. panamensis* (4,3%) (Tabla 5). En el peridomicilio se identificaron 18 especies, la más abundante fue *L. antunesi* (85,4%) seguida de *L. walkeri* (9,4%) y *L. panamensis* (2,9%) (Tabla 6), y en el extradomicilio se identificaron 19 especies, con el mismo orden en dominancia aunque en proporciones diferentes, *L. antunesi* (91%), *L. walkeri* (2,4%), *L. panamensis* (1,8%), *L. flaviscutellata* (1,4%) *y L. gomezi* (0,9%) (Tabla 7).

Tabla 4: Muestreo línea base de abundancia peridomiciliar de especies del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio

Especies de *Lutzomyia*	Barcelona						Cocuy						La Reforma					
	♀	%	♂	%	Total	%	♀	%	♂	%	Total	%	♀	%	♂	%	Total	%
L. antunesi	2.071	74,44	3.288	57,50	5.359	63,04	2.034	92,24	1.777	79,79	3.811	85,98	754	93,3	758	93,23	1.512	93,27
L. walkeri	622	22,35	2.358	41,23	2.980	35,058	79	3,58	400	17,96	479	10,8	44	5,44	53	6,51	97	5,98
L. panamensis	51	1,83	37	0,64	88	1,035	9	0,408	5	0,224	14	0,315	1	0,123	1	0,123	2	0,123
L. gomezi	13	0,46	21	0,36	34	0,4	74	3,35	43	1,93	117	2,639	0	0	0	0	0	0
L. fairtigi	4	0,14	7	0,122	11	0,129	5	0,226	2	0,089	7	0,15	1	0,123	0	0	1	0,061
L. begonae	14	0,5	0	0	14	0,164	4	0,18	0	0	4	0,09	4	0,49	0	0	4	0,246
L. saulensis	5	0,17	0	0	5	0,058	0	0	0	0	0	0	1	0,123	0	0	1	0,061
L. sordellii	1	0,035	3	0,052	4	0,047	0	0	0	0	0	0	2	0,247	0	0	2	0,123
L. vattierae	1	0,035	0	0	1	0,011	0	0	0	0	0	0	1	0,123	0	0	1	0,061
L. lichyi	0	0	1	0,017	1	0,011	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. punctigeniculata	0	0	2	0,034	2	0,023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. aragaoi	0	0	1	0,017	1	0,011	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. flaviscutellata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,123	1	0,061
Total	2.782		5.718		8.500		2.205		2.227		4.432		808		813		1.621	

Tabla 5. Abundancia intradomiciliar mensual de las especies del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio

Intradomicilio n=108	JUN		JUL		AGO		SEP		OCT		NOV		DIC		ENE		FEB		MAR		ABR		MAY		Total	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂		%
L. antunesi	12	9	27	18	39	48	4	3	4	4	11	3	26	16	60	44	74	64	13	7	127	78	23	10	724	85,98
L. walkeri	0	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	2	2	7	27	6	4	4	3	1	0	69	8,19
L. panamensis	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	1	0	10	10	1	3	2	2	2	0	0	1	36	4,27
L. fairtigi	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,11
L. gomezi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	0	3	0	1	0	0	0	0	0	9	1,06
L. sordelli	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0,23
L. vattierae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,11
Total	12	11	30	20	39	48	7	3	6	4	12	3	29	20	77	56	86	94	22	14	133	81	24	11	842	

Tabla 6. Abundancia peridomiciliar mensual de las especies del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio

Peridomicilio n=108	JUN		JUL		AGO		SEP		OCT		NOV		DIC		ENE		FEB		MAR		ABR		MAY			
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	Total	%
L. antunesi	328	296	51	28	30	30	169	94	150	63	50	15	202	158	748	390	526	584	63	76	711	664	180	83	5.689	85,45
L. aragaoi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0,03
L. begonae	1	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	8	0,12
L. barretoi barretoi	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0,015
L. barretoi majuscula	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,015
L. chagasi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,015
L. fairtigi	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	7	6	0	0	0	0	0	2	0	2	4	0	24	0,36
L. flaviscutellata	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	5	3	4	2	2	4	1	0	30	0,45
L. gomezi	0	2	2	5	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	6	7	5	6	2	0	0	0	3	1	43	0,64
L. micropiga	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,015
L. nematoducta	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0,07
L. panamensis	10	1	4	1	8	7	15	6	21	2	2	6	15	9	10	9	6	9	8	2	9	5	27	6	198	2,97
L. punctigeniculata	0	2	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0,07
Sciopemiya	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	3	0,04
L. saulensis	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,015
L. sordelli	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	7	0	1	0	1	0	0	0	16	0,24
L. vattierae	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	4	0,06
L. walkeri	40	239	15	5	2	4	6	14	4	2	3	0	5	8	21	79	21	91	23	10	18	6	5	4	625	9,38
Total	386	543	72	40	43	44	192	114	178	71	59	21	232	182	787	488	572	693	107	92	742	684	221	94	6.657	

Tabla 7. Abundancia extradomiciliar mensual de las especies del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio

Extradomicilio n=108	JUN		JUL		AGO		SEP		OCT		NOV		DIC		ENE		FEB		MAR		ABR		MAY		Total	%
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂		
L. antunesi	52	67	90	47	386	417	150	132	462	240	108	199	960	1.711	800	798	1.077	947	163	191	1.567	2.413	137	171	13.285	91
L. aragaoi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	1	0	1	0	0	0	11	17	0,11
L. barretoi barretoi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	4	0	0	1	0	0	0	9	0,06
L. barretoi majuscula	0	0	0	1	0	0	0	0	1	7	0	2	0	9	0	0	1	4	3	10	0	6	0	5	49	0,33
L. begonae	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0,03
L. chagasi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	3	0,02
L. fairtigi	0	1	1	4	0	6	0	1	22	18	0	1	18	30	0	0	0	1	0	2	0	9	0	0	114	0,78
L. flaviscutellata	6	12	5	6	0	0	9	15	7	5	6	5	16	13	17	9	19	6	9	8	18	6	5	2	204	1,39
L. gomezi	0	0	0	1	0	4	1	7	5	4	3	7	5	4	12	12	12	30	7	0	9	13	1	1	138	0,94
L. nematoducta	1	0	1	0	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	0	0	12	0,08
L. panamensis	7	3	9	2	26	9	11	8	2	5	5	5	32	13	28	15	19	17	1	0	13	6	35	4	275	1,88
L. preclara	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	7	0,04
L. punctigeniculata	0	0	0	1	1	2	2	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0	17	0,11
L. saulensis	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	7	0,04
Sciopemyia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	8	0	15	0,1
L. sordelli	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	8	0,05
L. vattierae	1	0	0	0	0	0	17	40	0	0	0	0	4	0	2	0	0	0	0	0	7	2	0	0	73	0,5
L. walkeri	5	9	16	2	6	2	0	0	12	8	12	0	14	9	27	24	38	23	33	23	26	38	15	13	355	2,43
L. yuilli	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,01
Total	73	93	123	66	425	443	191	207	512	293	135	219	1.054	1.794	887	861	1172	1.036	224	236	1.647	2.496	201	207	14.595	

3.2.2 Variación estacional

Para el análisis de los datos, se incluyeron machos y hembras por registrar densidades semejantes. Los datos fueron usados en totales por meses para las pruebas estadísticas, tomado como grupo el total de ejemplares del género *Lutzomyia*, el total de ejemplares del género *Lutzomyia* por hábitat de muestreo (intradomicilio, peridomicilio y extradomicilio) y el total para las especies más abundantes de importancia médica (Tabla 8). Los resultados del ANOVA muestran que la población total de *Lutzomyia* presenta variación estacional al registrar diferencias entre los meses de muestreo (F=5,20; P= 0,0004699), siendo diciembre, enero, febrero, y abril los meses de mayor abundancia de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Tukey (Tabla 9). En forma similar se observa esta tendencia para los valores totales de la población de *Lutzomyia* en el extradomicilio (F=5,142; P=0,0003954), y para el total de *L. antunesi* (F=4,990; P=0,0004903) y *L. antunesi* en el extradomicilio (F=5,985; P=0,0001269).

Tabla 8. Determinación de la variación estacional del total de las especies del género *Lutzomyia* y las principales especies de importancia médica en zona rural de Villavicencio

Grupos	Media	Desviación	GDL	F de Fisher	P
Total *Lutzomyia*	5,867	1,057	11	**5,020**	**0,0004699**
Total Intradomicilio	1,987	1,209	11	1,116	0,3911531
Total Peridomicilio	3,940	1,294	11	1,564	0,1734907
Total Extradomicilio	4,622	1,147	11	**5,142**	**0,0003954**
Total *L. antunesi*	5,641	1,198	11	**4,990**	**0,0004903**
L. antunesi Intra	2,275	1,307	11	1,387	0,2416655
L. antunesi Peri	4,213	1,494	11	1,652	0,1467425
L. antunesi Extra	5,092	1,321	11	**5,985**	**0,0001269**
Total *L. panamensis*	1,291	0,842	11	1,466	0,2084087
Total *L. gomezi*	1,524	0,845	11	2,156	0,0560897

En negrita, valores significativos al umbral alfa=0,05

Tabla 9. Determinación de la variación estacional de especies del género *Lutzomyia* por medio de pruebas de comparaciones múltiples (Tukey) para los grupos que presentaron valores significativos en el ANOVA

Total *Lutzomyia*

Categorías	Media	Agrupamientos		
Abr	7,390	A		
Ene	6,951	A		
Feb	6,931	A		
Dic	6,824	**A**	**B**	
Ago	5,644	**A**	**B**	**C**
Jun	5,571	**A**	**B**	**C**
May	5,523	**A**	**B**	**C**
Mar	5,389	**A**	**B**	**C**
Sep	5,350	**A**	**B**	**C**
Oct	5,335	**A**	**B**	**C**
Jul	4,761		**B**	**C**
Nov	4,734			C

Total *Lutzomyia* extradomicilio

Categorías	Media	Agrupamientos		
Abr	6,301	A		
Feb	5,704	**A**	**B**	
Ene	5,671	**A**	**B**	
Dic	5,661	**A**	**B**	
Ago	4,707	**A**	**B**	**C**
Oct	4,383	**A**	**B**	**C**
Mar	4,320	**A**	**B**	**C**
May	4,208	**A**	**B**	**C**
Sep	3,888		**B**	**C**
Nov	3,832		**B**	**C**
Jul	3,620		**B**	**C**
Jun	3,168			C

Total *L. antunesi*

Categorías	Media	Agrupamientos		
Abr	7,355	A		
Ene	6,843	**A**	**B**	
Feb	6,821	**A**	**B**	
Dic	6,735	**A**	**B**	
Ago	5,460	**A**	**B**	**C**
Jun	5,294	**A**	**B**	**C**
May	5,294	**A**	**B**	**C**
Sep	5,093	**A**	**B**	**C**
Mar	5,077	**A**	**B**	**C**
Oct	5,030	**A**	**B**	**C**
Nov	4,524		**B**	**C**
Jul	4,167			C

Total *L. antunesi* extradomicilio

Categorías	Media	Agrupamientos		
Abr	7,103	A		
Dic	6,482	**A**	**B**	
Feb	6,284	**A**	**B**	
Ene	6,267	**A**	**B**	
Ago	5,145	**A**	**B**	**C**
Mar	4,705	**A**	**B**	**C**
May	4,640		**B**	**C**
Oct	4,611		**B**	**C**
Sep	4,441		**B**	**C**
Nov	4,170		**B**	**C**
Jul	3,643			C
Jun	3,615			C

Distribución y formación de grupos no significativamente diferentes en negrilla. Valor crítico del d de Tukey: 5,099

Adicionalmente, se realizó una prueba de correlación de Pearson entre los valores totales de cada hábitat muestreado, total intradomicilio, total peridomicilio, total extradomicilio, y total de flebótomos recolectados, con la especie más abundante en cada hábitat y el total de las especies de importancia médica. Se encontró que *L. antunesi* fue la única especie que mostró correlación positiva para cada hábitat muestreado (*L. antunesi* Intra r=0,909-R^2=0,827; *L. antunesi* Peri r=0,977-R^2=0,955; *L. antunesi* Extra r=0,973-R^2=0,946) y con la abundancia total de *Lutzomyia* (r=0,989-R^2=0,978), siendo la especie más representativa en la zona de estudio (Tabla 10).

Se realizó también una prueba de correlación entre los valores de abundancia total mensual, tanto para el total de flebótomos recolectados como para los totales de cada especie de importancia médica por hábitat. Por otro lado, se estableció correlación entre la riqueza total por hábitat y el número de días de lluvia al mes, encontrando que tanto la abundancia total y extradomiciliar, como la riqueza total e intradomiciliar, presentan una correlación negativa frente al número de días de lluvia al mes (Tabla 11), es decir, los periodos lluviosos tienen un efecto en la disminución tanto la abundancia de *Lutzomyia* como el número de especies en la zona de estudio.

Tabla 10. Correlación entre el total de las especies del género *Lutzomyia* capturadas en cada hábitat y el total de las especies de importancia médica

Variables	Total Intradomicilio		Total Peridomicilio		Total Extradomicilio		Total *Lutzomyia*	
	R	R2	*r*	R2	*r*	R2	*r*	R2
L. antunesi Total	**0,572**	**0,327**	**0,566**	**0,320**	**0,910**	**0,828**	**0,989**	**0,978**
L. antunesi Intra	**0,909**	**0,827**	**0,479**	**0,229**	**0,503**	**0,253**	**0,584**	**0,341**
L. antunesi Peri	**0,487**	**0,238**	**0,977**	**0,955**	**0,380**	**0,144**	**0,638**	**0,408**
L. antunesi Extra	**0,527**	**0,278**	**0,370**	**0,137**	**0,973**	**0,946**	**0,928**	**0,862**
L. panamensis Total	0,236	0,056	0,177	0,031	0,279	0,078	0,302	0,091
L. flaviscutellata Total	**0,446**	**0,199**	**0,480**	**0,231**	**0,458**	**0,210**	**0,559**	**0,312**
L. gomezi Total	**0,532**	**0,283**	**0,370**	**0,137**	**0,434**	**0,189**	**0,453**	**0,205**

En negrita, valores significativos al umbral alfa=0,05
r: coeficiente de correlación de Pearson
R2: Coeficiente de determinación

Tabla 11. Correlación entre la abundancia de insectos del género *Lutzomyia* total y extradomiciliar y riqueza total e intradomiciliar con los días de lluvia.

Variable Independiente	Media	Desviación	*r*	R2	F de Fisher	P
No de días lluvia	18,500	6,038	1,000	1,000	--------	--------
Variable Dependiente						
Abundancia Total	7,121	0,931	**-0,605**	**0,366**	5,773	**0,037**
Abundancia Extra	6,581	1,084	**-0,675**	**0,456**	8,370	**0,016**
Riqueza Total	13,333	2,741	**-0,632**	**0,399**	6,638	**0,028**
Riqueza Intra	3,167	2,082	**-0,651**	**0,424**	7,354	**0,022**

En negrita, valores significativos al umbral alfa=0,05
***r*:** coeficiente de correlación de Pearson
R2: Coeficiente de determinación

En la Figura 4, se presenta la correlación entre la abundancia total de especies de *Lutzomyia* y el número de días de lluvia, donde en los primeros seis meses de muestreo se presentaron más de 20 días de lluvia al mes, y la abundancia mensual no supero los 1.200 ejemplares de *Lutzomyia* por trampa/noche en el mes muestreado. Por el contrario, en los meses en que los días de lluvia fueron menores a 10, se recolectaron más de 3.100 ejemplares por trampa/noche de *Lutzomyia* por mes; soportado por la diferencia de abundancia mensual evaluado con la prueba de ANOVA (F=5,20; P= 0,0004699), y la correlación negativa entre abundancia y días de lluvia con un *r*= -0,605; R^2=0,366, P= 0,037. En forma similar se muestra la variación de la riqueza de especies de *Lutzomyia* durante el año asociado al número de días de lluvia mostrando que la lluvia tiene un efecto negativo en el número de especies recolectadas tanto en el intradomicilio como para el total (*r*=-0,632; R^2=0,399, P=0,028). Aunque el número de especies en el extradomicilio es mayor comparado con los otros hábitats y la riqueza presentó correlación negativa con las lluvia, el modelo de correlación no fue significativo (*r*=-0,54; R^2=0,29, P=0,066).

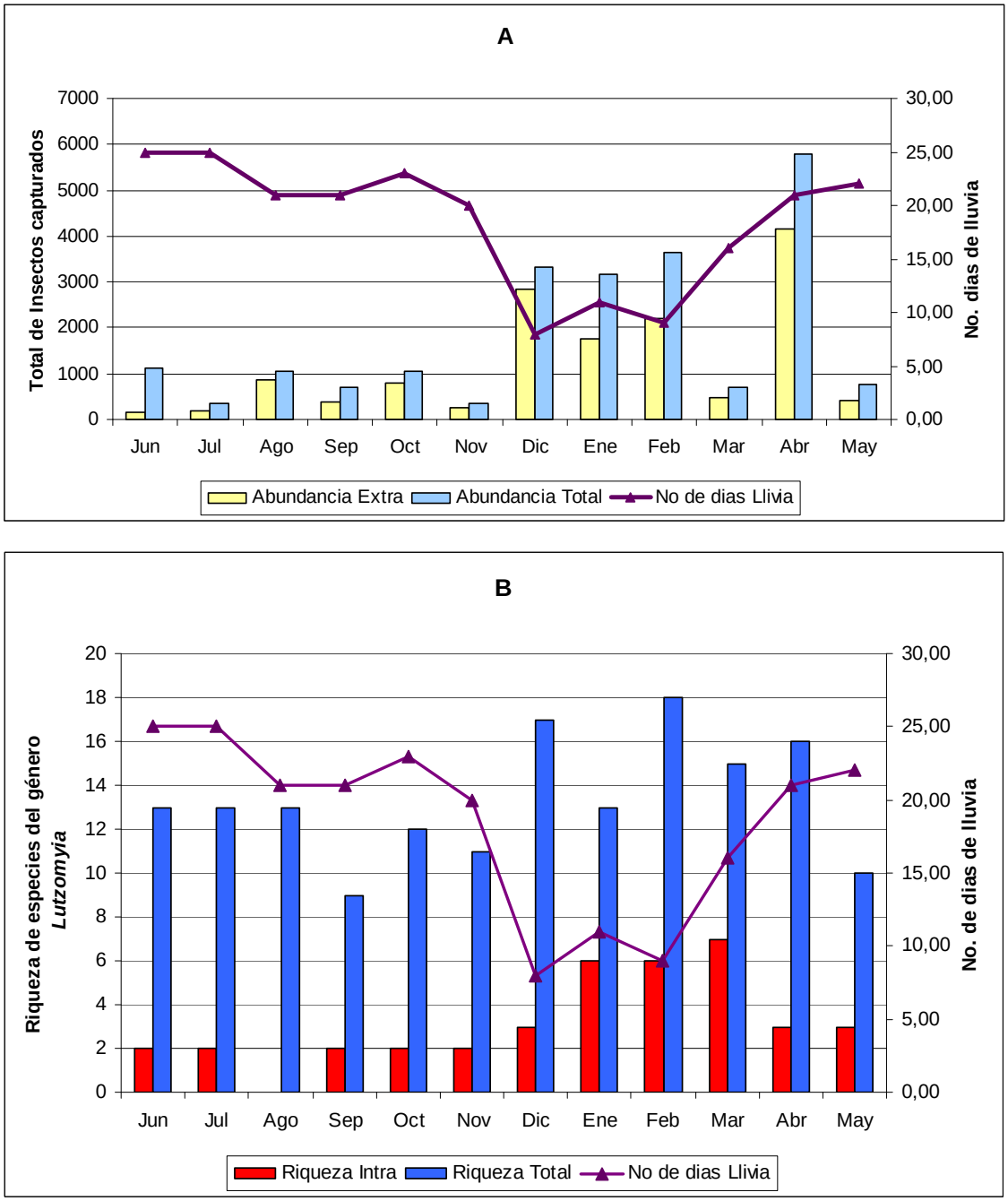


Figura 4. Variación estacional del total de insectos del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio, Meta, 2008-2009. Abundancia total y extradomiciliar vs. número de días de lluvia (A), riqueza total e intradomiciliar vs. número de días de lluvia (B)

3.3 Determinantes ambientales que influyen en la abundancia estacional de las especies de *Lutzomyia*.

3.3.1 Análisis de componentes principales (ACP) de los determinantes ambientales

Los resultados del ACP, muestran que hasta los primeros 20 componentes principales se explica el 95,8% de la varianza, y por cada componente que se adicione a partir de este punto, solo se gana menos del 0,3% de varianza hasta el 99%. Por lo tanto, como no se encontró una correlación significante entre los determinantes ambientales, y los primeros componentes sólo explican menos del 40% de la varianza, se decidió utilizar todas las variables determinantes ambientales para determinar qué factores influyen en la abundancia estacional de especies de *Lutzomyia*.

3.3.2 Determinantes ambientales de abundancia de insectos del género *Lutzomyia*.

De las variables climáticas evaluadas como determinantes de abundancia, basados en el análisis de correlación de Spearman, se identificaron tres determinantes que explican en forma negativa y positiva la abundancia de especies de *Lutzomyia*: 1) la precipitación del día del muestreo, 2) la temperatura máxima, 24 horas antes del muestreo (29-30° C) y 3) la temperatura mínima, 48 horas antes del muestreo (20-22° C) (Tabla 12), siendo la precipitación del día, el determinante que más explica la abundancia total de *Lutzomyia* en el estudio con un r = -0,704; P< 0,05.

L. antunesi, por ser la especie más abundante, presentó un comportamiento similar al total de insectos recolectados, siendo afectado de la misma manera por la precipitación del día del muestreo (r = -0,688; P< 0,05), así como en todos los hábitats de muestreo (intra, peri y extradomicilio). Con relación a la temperatura máxima 24 horas antes del muestreo, la correlación más fuerte se presentó para *L. antunesi* capturada en el peridomicilio (r= 0,550; P< 0,05), y la temperatura mínima, 48 horas antes del muestreo, demostró ser determinante para la abundancia principalmente en el extradomicilio (r= 0,527; P< 0,05).

L. gomezi, presentó correlación entre la temperatura máxima del día de la captura (29-31° C) con los recuentos totales de abundancia para la especie (r= 0,627; P< 0,05), así

como con la abundancia en el extradomicilio (r=0,566; P< 0,05). Otros determinantes demostraron estar correlacionados con la abundancia de *L. gomezi*, aunque con coeficientes bajos. Las horas de brillo solar aumentó la abundancia total y principalmente extradomiciliar, y la velocidad del viento del día anterior al muestreo disminuyó la abundancia intradomiciliar de *L. gomezi* (*r*= -0,384; P< 0,05).

Para *L. panamensis*, los principales determinantes fueron la precipitación durante el día del muestreo, disminuyó su abundancia total, mientras las horas de brillo solar del día del muestreo y la temperatura máxima del día anterior del muestreo, aumentó la abundancia total y extradomiciliar respectivamente. *L. fairtigi*, presentó correlación únicamente con la humedad relativa 48 horas antes del muestreo, la cual aumentó su abundancia total (*r*=0,494; P< 0,05) y peridomiciliar (*r*=0,418; P< 0,05).

Tabla 12. Determinantes ambientales de abundancia de especies del género *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio

	Precipitación Día	Temp Media Día °C	Temp Max Dia°C	Temp Max <24H°C	Temp Min <48H°C	HR % <48H	BS Horas Día	V/viento Med m/s <24H
Total *Lutzomyia*	**-0,704**	0,192	0,260	**0,378**	**0,431**	0,050	0,214	-0,131
Total Intra	**-0,525**	0,258	0,193	**0,346**	**0,423**	0,246	0,297	-0,165
Total Peri	**-0,514**	0,079	0,186	**0,514**	0,198	0,044	0,142	0,073
Total Extra	**-0,670**	0,271	**0,331**	0,256	**0,492**	0,058	0,279	-0,182
L. antunesi	**-0,688**	0,179	0,257	**0,382**	**0,441**	0,052	0,199	-0,142
L. antunesi Intra	**-0,507**	0,243	0,210	**0,346**	**0,337**	**0,369**	0,272	-0,179
L. antunesi Peri	**-0,509**	0,138	0,227	**0,550**	0,180	0,070	0,189	0,008
L. antunesi Extra	**-0,579**	0,297	**0,364**	0,266	**0,527**	0,001	0,277	-0,105
L. flaviscutellata	**-0,384**	0,107	0,307	**0,419**	**0,356**	0,096	0,190	-0,035
L. flavis. Peri	-0,144	0,040	0,299	0,224	**0,456**	0,081	0,075	0,247
L. flavis. Extra	**-0,340**	0,162	0,275	0,292	0,226	0,002	0,192	-0,105
L. panamensis	**-0,408**	**0,372**	**0,378**	**0,342**	0,326	0,049	**0,420**	-0,266
L. pana Intra	-0,104	0,178	0,309	**0,452**	0,001	-0,118	**0,388**	-0,105
L. pana. Peri	-0,263	**0,353**	0,207	0,281	0,214	0,067	0,270	0,080
L. pana Extra	-0,283	0,143	0,296	0,226	0,210	-0,037	0,298	**-0,352**
L. gomezi	-0,122	**0,481**	**0,627**	**0,383**	**0,335**	-0,207	**0,498**	-0,207
L. gomezi Intra	-0,152	0,215	**0,413**	0,259	0,096	-0,229	0,321	**-0,384**
L. gomezi Peri	-0,188	0,258	**0,408**	**0,413**	0,237	-0,013	**0,348**	0,034
L. gomezi Extra	-0,143	**0,501**	**0,566**	0,307	**0,334**	-0,201	**0,445**	-0,281
L. fairtigi	-0,182	**0,348**	0,204	0,006	0,135	**0,494**	0,171	-0,223
L. fairtigi Intra	0,092	0,281	0,305	0,258	0,000	-0,059	0,315	-0,254
L. fairtigi Peri	-0,281	0,309	0,187	0,069	0,174	**0,418**	0,141	-0,013
L. fairtigi Extra	-0,114	0,213	0,177	-0,070	0,109	**0,353**	0,108	-0,313

Coeficiente de correlación de Spearman
En negrita, valores significativos al umbral alfa=0,05 (prueba bilateral)

3.3.3 Correlación de Pearson y modelación de variables de abundancia y temperatura por regresión lineal

Basado en los resultados de las pruebas de cumplimiento de supuestos de normalidad, se evaluaron las variables de temperatura como determinantes de la abundancia mediante pruebas de correlación de Pearson, donde la abundancia total intradomiciliar y peridomiciliar de especies de *Lutzomyia,* esta correlacionada de forma positiva con la temperatura máxima del día anterior a la captura (media= 29,989° C), mientras que la abundancia total y extradomiciliar de *L. gomezi* se correlacionó con la temperatura media del día de la captura (media= 25,165° C) (Tabla 13).

Tabla 13. Temperatura como determinante ambiental de abundancia de especies de *Lutzomyia* en zona rural del municipio de Villavicencio

	Temperatura media °C día		Temperatura maxima °C <24H	
	r	R2	*r*	R2
Total *Lutzomyia*	0,196	0,039	**0,345**	**0,119**
Total Intra	**0,330**	**0,109**	**0,498**	**0,248**
Total Peri	0,068	0,005	**0,595**	**0,354**
Total Extra	**0,260**	**0,068**	0,213	0,046
L. antunesi Intra	0,209	0,044	**0,313**	**0,098**
L. antunesi Peri	**0,289**	**0,083**	**0,458**	**0,209**
L. antunesi Extra	0,125	0,016	**0,591**	**0,349**
L. antunesi Intra	**0,291**	**0,085**	0,230	0,053
L. pana Extra	0,179	0,032	0,132	0,017
L. gomezi	**0,511**	**0,261**	**0,436**	**0,190**
L. gomezi Extra	**0,524**	**0,274**	**0,324**	**0,105**
L. flavis. Extra	0,171	0,029	**0,312**	**0,098**
L. pana. Peri	**0,275**	**0,076**	**0,278**	**0,077**

Correlación de pearson. r =Coeficiente de correlación de Pearson R2=Coeficiente de determinación. En negrita, valores significativos al umbral alfa=0,05 (prueba bilateral)

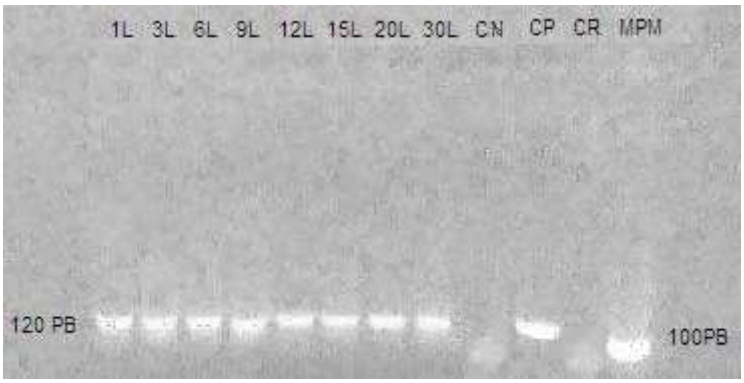
Para cada uno de las variables climáticas que presentaron una correlación significativa y un coeficiente de determinación explicativo de abundancia superior al 25%, se realizaron modelos de regresión lineal simple, y los valores de correlación entre las variables de abundancia y temperatura fueron regulares, en el cual, más del 70% del comportamiento de la variable Y no es explicada en función de la X. Por ejemplo; en el Anexo 2, se muestra el modelo de regresión lineal del total de insectos del género *Lutzomyia* capturadas en el intradomicilio en función a la temperatura máxima 24 horas antes de la recolección, el cual presenta un r= 0,498, R^2=0,248 (P< 0,05), y una calidad del modelo con un F de Fisher = 11,23; P= 0,002. En el modelo, se muestra que por

cada 0,48 grados, la abundancia insectos del género *Lutzomyia* aumenta una unidad exponencial.

3.4 Determinación de tasas de infección mensual de especies del género *Lutzomyia* con *Leishmania* spp. y su asociación con determinantes ambientales

3.4.1 Valoración de la sensibilidad de la prueba de la PCR

Los resultados de las pruebas de PCR a grupos crecientes de ejemplares de *Lutzomyia* para valorar el efecto de la cantidad de insectos por grupo y la pérdida de sensibilidad de la prueba, mostraron que la misma calidad de amplificación de ADN de los iniciadores OL1 y OL2 se obtuvo para el grupo 1, que tenía un 1 ejemplar de *Lutzomyia longipalpis* en una solución a una concentración de 10 parásitos de *L. chagasi*/10µl en etanol al 96%, 1L (un ejemplar de *Lutzomyia* utilizada) de la Figura 5, como para el grupo 8 que tenia 30 flebótomos con igual concentración de parásitos, 30L (30 ejemplares de *Lutzomyia* utilizados) en la Figura 5.



1L: 1 *Lutzomyia* + 10 *L. chagasi*/10µl
3L: 3 *Lutzomyia* + 10 *L. chagasi*/10µl
6L: 6 *Lutzomyia* + 10 *L. chagasi*/10µl
9L: 9 *Lutzomyia* + 10 *L. chagasi*/10µl
12L: 12 *Lutzomyia* + 10 *L. chagasi*/10µl
15L: 15 *Lutzomyia* + 10 *L. chagasi*/10µl
30L: 30 *Lutzomyia* + 10 *L. chagasi*/10µl
CN: 3 *Lutzomyia*
CP: 10 *L. chagasi*/10µl
CR: Mezcla de PCR + Agua tipo I

Figura 5. Sensibilidad de la PCR con los incitadores OL1 y OL2. Cantidades crecientes de flebótomos desde 1 hasta 30 ejemplares, cada grupo con 10 parásitos de *L. chagasi*/10µl.

Para los ensayos de evaluación de los conceptos de repetibilidad y reproducibilidad, se realizaron tres réplicas de la pruebas de PCR a las 118 muestras, las cuales se seleccionaron aleatoriamente del conjunto total de 711 grupos de *Lutzomyia* obtenidos para la identificación de infección natural. Se determinó una prevalencia del 3,4% [4(+) y 114(-)] en las tres repeticiones de la prueba de PCR realizada, obteniendo resultados positivos en las mismas muestras durante las tres replicas. La obtención de los resultados esperados en la prevalencia de prueba, el tamaño de amplificación de ADN

esperado (≈ 120 pb), y la misma capacidad de amplificación con aumento de insectos por grupos permitió establecer que el protocolo estandarizado aporta resultados confiables para el desarrollo de la búsqueda de infección natural usando los iniciadores OL1 y OL2.

3.4.2 Tasa de infección natural mensual de especies del género *Lutzomyia* con *Leishmania* spp

Los resultados de la tasa de infección mensual para el total de flebótomos recolectados muestran que se presentan hembras positivas a *Leishmania* spp. principalmente en los meses de menor precipitación (noviembre a febrero), así como en los meses durante los cuales se registró alta densidad (diciembre, enero y abril). *L. antunesi* además de ser la especie más abundante, registró tasas de infección natural mensual constante en el tiempo. *L. flaviscutellata, L. panamensis* y *L. gomezi*, confirman su importancia como vector al presentar infección natural con abundancias muy bajas comparadas con las de *L. antunesi* (Tabla 14).

Tabla 14. Tasa de infección natural mensual para el total de insectos del género *Lutzomyia*, por zona de muestreo y para las especies de importancia médica

	Total *Lutzomyia*	Total Intra	Total Peri	Total Extra	*L. antunesi*	*L. flaviscutellata*	*L. panamensis*	*L. gomezi*
Junio	0	0	0	0	0	0	0	0
Julio	0	0	0	0	0	0	0	0
Agosto	0,0192	0,048	0,093	0,0092	0,0044	0,16	0,19	0
Septiembre	0	0	0	0	0	0	0,04	0,66
Octubre	0	0	0	0	0	0	0	0
Noviembre	0,082	0,42	0,101	0,037	0,047	0,57	0,25	0,4
Diciembre	0,0106	0	0,022	0,0085	0,0042	0,058	0,105	0,33
Enero	0,049	0,64	0,0051	0,037	0,047	0,055	0,076	0,15
Febrero	0,0027	0	0,0035	0,0026	0,0012	0,125	0	0
Marzo	0	0	0	0	0	0	0	0
Abril	0,0012	0	0,004	0	0,0013	0	0	0
Mayo	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0,0125	0,116	0,006	0,008	0,0102	0,0753	0,0485	0,103
	135/10760	56/479	24/3606	54/6675	99/9707	11/146	15/452	9/87

3.4.3 Correlación y asociación entre determinantes ambientales y variables fisiológicas de *L. antunesi* e infección natural con *Leishmania* spp.

Los resultados de las pruebas de correlación de rangos de Spearman entre determinantes ambientales y variables fisiológicas, mostraron que existe una correlación significativa pero baja para las variables fisiológicas en función a las variables ambientales. La temperatura máxima 15 días antes del muestreo demostró un efecto positivo sobre las variables hembras con sangre fresca, hembras con huevos de IV o V estadio y sangre, y hebras con huevos de IV o V estadio, y la precipitación 24 horas y 48 horas antes del muestreo mostró un efecto negativo. Como principal resultado se presenta el aumento de hembras positivas a la PCR con la temperatura máxima 15 días antes del muestreo (r=0,590; P< 0,05), y la disminución de hembras con sangre fresca con la precipitación 48 horas antes del muestreo (r=-0,589; P< 0,05) (Tabla 15).

Tabla 15. Correlación entre determinantes ambientales y variables fisiológicas de *L. antunesi* en zona rural de Villavicencio

	Temp Max °C <15D	Precipitación <24H	Precipitación <48H
PCR Positivas	**0,590**	**-0,481**	-0,297
Hembras con huevos de IV o V estadio	**0,397**	**-0,348**	**-0,359**
Hembras con sangre fresca	**0,508**	**-0,389**	**-0,589**
Hembras con huevos de IV o V estadio y sangre	**0,504**	-0,170	**-0,418**

Coeficiente de correlación de Spearman
En negrita, valores significativos al umbral alfa=0,05 (prueba bilateral)

Las pruebas de asociación o independencia realizadas a las variables de determinantes ambientales y que presentaron correlación significativa con las variables fisiológicas y la proporción de infección, demostraron que la temperatura es el principal factor de riesgo con asociación causal para la presencia de hembras de *L. antunesi* PCR positivas para *Leishmania* spp. (Chi^2=18,129; P< 0,0001), con 2,4 veces más probabilidad de encontrar hembras positivas cuando la temperatura máxima 15 días antes del muestreo es mayor a 30,5° C. La presencia de hembras con huevos y sangre mostró de igual forma ser dependiente al mismo determinante ambiental (Temp. Max>30,5° C <15 días) (Chi^2=137,102; P=< 0,0001), con 3,5 veces más probabilidad de encontrar hembras con huevos y con sangre a una temperatura máxima superior a 30,5° C 15 días antes de realizar el muestreo.

Por el contrario, la presencia de hembras de *L. antunesi* con huevos y alimentación reciente (sangre fresca), muestran dependencia con la temperatura máxima superior a 30,5° C 15 días antes de realizar el muestreo (Chi^2=385,192; P=< 0,0001 - Chi^2=8,222; P=0,004, respectivamente), pero se presenta como un factor protector (OR=0,293; IC=0,25-0,33) al tener 3,4 veces menor probabilidad de encontrar hembras de *L. antunesi* con huevos (OR=0,677, IC=0,51-0,88) y 1,47 veces menor probabilidad de encontrar hembras con alimentación reciente, bajo dichas condiciones ambientales.

Por último, los resultados muestran que la precipitación mayor a 5 mm 24 horas y 48 horas antes del muestreo, son factores de protección frente a la presencia de hembras de *L. antunesi* con alimentación reciente o con huevos (OR=0,2652; OR=0,2651; respectivamente), al presentar 3,5 veces menor probabilidad de encontrar hembras alimentadas o con huevos, si la precipitación es mayor a 5 mm 48 horas antes del muestreo y una probabilidad 2,8 veces menor de encontrar hembras alimentadas (OR=0,35) si la precipitación es mayor a 5 mm 24 horas antes del muestreo.

Tabla 16. Odds Ratio de los determinantes ambientales correlacionados con variables fisiológicas y proporción de infección mensual.

	Temp Max 30,5° C <15D			
	Chi^2	P	OR	IC
PCR Positivas	18,129	< 0,0001	2,405678792	1,586 a 3,649
Huevos	385,192	< 0,0001	0,293228537	0,258 a 0,333
Sangre Fresca	8,222	0,004	0,677549954	0,518 a 0,885
Huevos y Sangre	137,102	< 0,0001	3,498495486	2,802 a 4,368
	Precipitación <48H			
	Chi^2	P	OR	IC
Huevos	269,645	< 0,0001	0,265162753	0,224 a 0,313
Sangre Fresca	51,007	< 0,0001	0,265229778	0,179 a 0,391
	Precipitación <24H			
	Chi^2	P	OR	IC
Sangre Fresca	3,841	< 0,0001	0,357914363	0,252 a 0,507

4. DISCUSIÓN

La riqueza de especies de *Lutzomyia* para la Orinoquía y Amazonía colombiana es muy alta, posee cerca del 64% de la fauna del país, y a nivel ecorregional el departamento del Meta tiene la mayor riqueza al tener registradas 45 especies (Montoya y Ferro, 1999; Bejarano *et al.* 2004). En el presente estudio, se identificaron 20 especies de *Lutzomyia*, encontrándose diferencias entre la riqueza intradomiciliar (Tabla 5) con la peridomiciliar (Tabla 6) y extradomiciliar (Tabla 7), pero no entre las dos últimas. Los subgéneros con mayor presencia y abundancia fueron *Nyssomyia, Psychodopygus* y *Lutzomyia*, y las especies antropofílicas y de importancia médica pertenecientes a estos fueron *L. antunesi, L. flaviscutellata, L. panamensis* y *L. gomezi*, semejante a estudios realizados anteriormente en la Orinoquía y Amazonía colombiana (Barreto *et al.* 2000, Cabrera *et al.* 2009, Wolff *et al.* 2003, Bejarano *et al.* 2007, Molina *et al.* 2008).

A nivel ecorregional, el comportamiento ecológico de cada foco de leishmaniasis cutánea presenta diferentes características de acuerdo a cada nicho específico, su posible vector, y comportamiento de abundancia influenciado por los determinantes ambientales propios de la zona. En el departamento de Casanare, Molina *et al.* (2008), mostraron que la especie más abundante fue *L. fairtigi*, presentando variación estacional y abundancia con correlación positiva con la precipitación (R=0,675; P=0,001), mientras, *L. antunesi* no presentó variación estacional y ninguna asociación con determinantes ambientales. En contraste, el presente estudio mostró que tanto la población total de *Lutzomyia,* como la especie *L. antunesi* presentan variación estacional en su abundancia (F=5,20, P=0,0004699 - F=4,990; P=0,0004903, respectivamente), aumenta en los meses de verano y disminuye en los meses de mayor precipitación (r=-0,605, R^2=0,366; P=0,037), y para las demás especies de importancia médica identificadas en el estudio (*L. panamensis, L. falviscutellata, L. gomezi* y *L. fairtigi*), no se demostró variación estacional.

Los resultados de las pruebas de correlación de Spearman mostraron que la relación entre los datos de abundancia y determinantes ambientales son acordes, la relación entre lluvia y temperatura máxima es inversa y ambas demostraron tener un efecto directo sobre la abundancia, cuando llueve, la abundancia de *Lutzomyia* disminuye al igual que la temperatura máxima, y en el momento que se presenta dominio de temperatura

máxima la abundancia de *Lutzomyia* aumenta y por lo general son días soleados y noches que no presentan lluvias. Del mismo modo se presenta la relación entre *L. antunesi* y la precipitación del día de la captura (r = -0,688; P< 0,05) o temperatura máxima 24 horas antes del muestreo (r= 0,55; P< 0,05).

La correlación positiva de la abundancia con la temperatura máxima 24 horas antes del muestreo y temperatura mínima 48 horas antes del muestreo, puede ser explicada por el efecto en los mecanismos para acelerar el desarrollo del ciclo de vida o estimular el fin de periodos de diapausa, estado fisiológico con el fin de sobrevivir a condiciones ambientales adversas (Killick-Kendrick, 1978; Croset, 1980). Por otra parte, con respecto a la precipitación, Davies *et al.* (2000) propusieron que un incremento en la abundancia para muchas especies de *Lutzomyia* durante la estación lluviosa puede deberse a un efecto en la longevidad del adulto de *Lutzomyia*, efecto que no puede ser asociado al presente estudio en el que se obtuvo correlación negativa con la precipitación, por lo tanto, la disminución en la abundancia puede ser atribuida principalmente a procesos de disminución en la actividad fisiológica de las larvas de IV estadio (Killick-Kendrick, 1978) o efectos mecánicos en los sitios de cría (muerte de estadios inmaduros en los sitios de cría por lluvia).

Con relación a las especies de importancia médica incriminadas en el país, la abundancia de *L. gomezi* presenta correlación positiva con la temperatura máxima del día, tanto para el total de la especie (r= 0,627; P< 0,05), como para su abundancia en el extradomicilio (r=0,566; P< 0,05). Otro factor asociado con el aumento en la abundancia son las horas de brillo solar (r= -0,384; P< 0,05), factor asociado con la temperatura máxima (r=0,627), que en forma lógica ambos influyen sobre la abundancia. El aumento en la abundancia durante los meses de verano (diciembre, enero y febrero) es coincidente con reportes realizados en el norte de Venezuela, donde *L. gomezi* presentó un aumento en las densidades durante la estación seca (Feliciangeli, 1987).

Para *L. panamensis*, los principales determinantes fueron la precipitación del día del muestreo, el cual disminuyó su abundancia total, mientras las horas de brillo solar y la temperatura máxima del día anterior, aumentan la abundancia, comportamiento

contrario a lo reportado en el norte de Venezuela donde las densidades de *L. panamensis* presentaron un importante aumento con la lluvia (González *et al.* 1999).

L. fairtigi, presentó correlación únicamente con la humedad relativa 48 horas antes del muestreo, el cual presento un aumento de su abundancia total y peridomiciliar similar a lo reportado en el departamento de Casanare, donde *L. fairtigi* presentó una correlación positiva entre la humedad relativa y la variación mensual de las densidades, explicado con un R^2= 0,652 (P = 0,002) (Molina *et al.* 2008).

Pese a que se realizó transformación logarítmica de los recuentos de abundancia, con lo cual se logró que la distribución de los datos cumplieran el requisito paramétrico para realizar una regresión lineal, los resultados obtenidos en las correlaciones de Pearson solo nos ofrece una aproximación a la explicación de cómo la variable temperatura afecta la abundancia, debido a que los muestreos no son representativos de un rango de tiempo prolongado, es apresurado dar conclusiones al respecto aunque el modelo log-lineal sea significativo.

Los resultados obtenidos de las correlaciones de Spearman y Pearson mostraron que los principales determinantes ambientales son la precipitación y la temperatura para la abundancia de *Lutzomyia* en la zona endémica de Villavicencio, mostrando que la precipitación tiene efecto negativo en la densidad para las especies más abundantes, mientras que la temperatura produce un efecto contrario. Tomando en cuenta los resultados, la respuesta biológica no puede alinearse con parámetros propuestos en la literatura (Killick-Kendrick, 1978; Croset, 1980; Davies *et al.* 2000) debido principalmente a que cada nicho ecológico es único y el desarrollo del ciclo de transmisión de la leishmaniasis es multifactorial, donde los eslabones de la eco-epidemiología (agente etiológico-vector-ambiente) están entrelazados de manera compleja, siendo ambicioso proponer de manera definitiva un modelo predictivo para la zona.

Ahora, la valoración de la sensibilidad de la PCR en la detección de parásitos de *Leishmania* en el presente estudio, se realizó con el fin de demostrar la confiabilidad de la técnica para determinar la tasa de infección natural. Los resultados mostraron que los iniciadores OL1 y OL2 pueden detectar infección en un grupo de hasta 30 ejemplares de

Lutzomyia con solo un ejemplar teóricamente infectado. La sensibilidad estable de la técnica, puede atribuirse al proceso de estandarización realizado por Cabrera *et al.* (2002), donde se modificó la cantidad de iniciadores utilizados de 200 ng propuesto por Romero *et al.* (2001) a 400 ng, lo que aumenta su capacidad de detección como sonda en la fase de anillamiento. Adicionalmente, la estabilidad de la técnica fue puesta a prueba en repeticiones bajo diferentes condiciones tanto ambientales como técnicas, mostrando que es repetible y reproducible al ser utilizada en el Laboratorio de genética de la Universidad de los Llanos, como en otras investigaciones para la identificación de infección natural en *Lutzomyia* (Flórez *et al.* 2006; Vásquez-Trujillo *et al.* 2008).

La identificación de etapas fisiológicas de las hembras en el estudio (hembras con sangre, huevos estadio IV o V, o hembras con sangre y huevos) sometidas a la detección de infección natural, fue propuesto para considerar durante el análisis de los resultados las características cualitativas necesarias para juzgar una especies de *Lutzomyia* como vector potencial o eficiente de *Leishmania* (Lane, 1993). Según las etapas de desarrollo del parásito luego de una alimentación sanguínea, la presencia de parásitos puede identificarse en el estómago si es una alimentación reciente de los 0 a 4 días, o en la faringe de 7 a 14 días, soportando el desarrollo del parásito y presentando formas infectivas de promastigotes listas para la inoculación cerrando el ciclo (Sacks y Kamhawi, 2001). Con base en esto, y al ser difícil establecer de forma cualitativa las características necesarias para considerar una especie vector, las hembras se procesaron separando el abdomen del tórax y la cabeza, con el fin de buscar de forma objetiva las hembras que posean formas infectivas de *Leishmania*, y proponer como vector eficiente las especies con resultados positivos obtenidos en la PCR.

Los resultados de infección natural muestran que las especies de importancia médica (*L. flaviscutellata, L. panamensis* y *L. gomezi*) confirman su carácter como posible vector para la zona endémica de leishmaniasis cutánea de Villavicencio, al presentar tasas de infección constante principalmente en los meses de verano (noviembre a febrero), en abundancias muy bajas, y especialmente en zonas boscosas (extradomicilio). Estudios realizados en áreas selváticas de Colombia, muestran que *L. flaviscutellata* por su comportamiento antropofílico puede cumplir un papel como vector en el departamento de Guaviare (Cabrera *et al.* 2009). En Brasil, en el estado de Amazonas es predominante en selvas y sabanas, y está implicada como posible vector de *L. (L) amazonensis*,

propuesta como una de las especies de mayor importancia epidemiológica en la región, y en Venezuela se identificó como posible vector de leishmaniasis cutánea en el estado de Bolívar (González y Devera, 1999; Ribeiro *et al.* 2007; Santos da Silva *et al.* 2010).

L. gomezi y *L. panamensis* han sido postuladas como vectores de *Leishmania (V.) braziliensis* e incriminadas en la transmisión de leishmaniasis cutánea en Venezuela (Rodriguez *et al.* 1999), en Colombia se ha demostrado que poseen gran capacidad de adaptación a cambios ambientales en su hábitat además de ser potenciales vectores de leishmaniasis cutánea (Travi *et al.* 2002, Sandoval *et al.* 2006). Son especies con amplia distribución, presente en gran parte del territorio nacional (Montoya y Ferro, 1999; Bejarano *et al.* 2004) y recientemente incriminadas en la transmisión de *Leishamanai (V.) panamensis* peridomiciliar en un foco activo de leishmaniasis cutánea en Boyacá, con tasas de infección natural de 0,5 y 0,6% respectivamente (Santamaría *et al.* 2006).

En el presente estudio, se demuestra la importancia epidemiológica de *L. gomezi, L. panamensis* y *L. flaviscutellata* al presentar tasas de infección natural máxima de 40, 25 y 57 % en el mes de noviembre y comportamiento antropofílico, además de los antecedentes vectoriales anteriormente expuestos. Ahora, se reconoce que las poblaciones de *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo se caracterizan por presentar bajas tasas de infección natural que van entre 0.1 a 1.9% (Travi *et al.* 1988), pero las altas tasas encontradas para las principales especies de importancia médica identificadas en la zona de estudio son debidas a las bajas abundancias encontradas mensualmente y su posible efectividad como vector en la zona.

Por otra parte, *L. antunesi* presenta tasas de infección entre 0,1 a 4,7%, proporciones acordes a lo reportado por la literatura (Travi *et al.* 1988). *L. antunesi*, sobresale como la especie dominante en la zona de estudio, presente tanto en zonas antrópicas (intradomicilio y peridomicilio) como en el extradomicilio en grandes abundancias (85, 85 y 91% para cada zona, Tabla 5, 6 y 7). Aunque esta especie no ha sido considerada de importancia médica en el país, se ha identificado en regiones de alta incidencia de leishmaniasis cutánea, con proporciones iguales o mayores comparada con las especies ya incriminadas, sin tener en cuenta su presencia para la transmisión de la enfermedad (Sandoval *et al.* 2006). Ryan *et al.* (1984), identificó por primera vez infección natural de *L. antunesi* con flagelados en un foco de leishmaniasis visceral en Brasil, el primer

nexo epidemiológico se registro en el departamento de Amazonas, donde *L. antunesi* se consideró como especie importante al estar presente en altas abundancias tanto en el intradomicilio como en el peridomicilio para zonas rurales y periurbanas del municipio de Leticia durante un foco activo (Ferro *et al.* 1997), y por último se demostró la infección natural con *Leishmania* spp. en un foco de leishmaniasis cutánea en zona rural de Villavicencio obteniendo una tasa de infección de 1,6% (Vásquez-Trujillo *et al*. 2008).

Las características eco-epidemiológicas anexas a la identificación de infección natural de *L. antunesi*, además de ser la especie más abundante en la zona, se observaron por medio de pruebas de correlación de variables fisiológicas e infección natural con *Leishmania* spp. con determinantes ambientales. Los resultados obtenidos demostraron que, la temperatura máxima 15 días antes del muestreo actúa como un factor de riesgo asociado a la presencia de hembras de *L. antunesi* positivas o infectadas naturalmente en una fase de desarrollo del parasito apta para la transmisión a un nuevo hospedero, y ubicado en áreas anatómicas anteriores del insecto (Sacks y Kamhawi, 2001), soportado con un r=0,59; P=< 0,0001, y las pruebas de Chi^2=18,12; P=< 0,0001, OR=2,4. Estas asociaciones con 15 días de rezago en la temperatura indican indirectamente que este determínate puede influir en diferentes aspectos biológicos de *L. antunesi* como el aumento en la actividad fisiológica de las larvas de IV estadio, aumento en la emergencia de adultos y disminución en los ciclos gonadotróficos (Killick-Kendrick, 1978), evidente en la asociación entre la temperatura máxima 15 días antes del muestreo y la presencia de hembras con huevos y nuevamente alimentadas (Chi^2=137,102; P=< 0,0001, OR, 3,49).

Estas evidencias de asociación y causalidad entre determinantes ambientales (temperatura y precipitación) e infección natural permiten concluir que *L. antunesi* puede soportar el desarrollo del parásito, permitiendo su crecimiento a estadios infecciosos; además de características epidemiológicas importantes asociadas como la presencia de hembras con huevos de IV o V estadio alimentadas, mostrando una toma de sangre para el desarrollo de huevos y realimentación por lo menos cinco días después siendo evidente una posible transmisión del parásito, lo que admitiría considerar a una especie vector potencial (Young y Lewyer, 1987; Killick-Kendrick, 1990; Lane, 1993).

Para los demás factores fisiológicos analizados de *L. antuensi*, asociados con los determinantes ambientales, demuestra que tanto la temperatura como la precipitación juegan un papel fundamental en procesos de desarrollo del vector, abundancia, ciclo reproductivo, alimentación y riesgo de infección natural del vector (Killick-Kendrick, 1978), así como la posible transmisión del parasito (Tabla 16). Los resultados además muestran que, la identificación de hembras con huevos o alimentación reciente es dependiente de la temperatura y la precipitación, y brindan información epidemiológica al mostrar la oportunidad de encontrar diferentes características fisiológicas de acuerdo al comportamiento climático presente en la zona endémica de Villavicencio, así como el riesgo de transmisión de la enfermedad.

Feliciangeli (1987) demostró que las abundancias de *L. gomezi* y *L. ovallesi* aumentan durante la estación seca, y que además su abundancia se encontraba asociada a la incidencia de leishmaniasis cutánea en el norte de Venezuela en un 33,8% y 52,9% para las dos especies respectivamente. Si bien esta investigación ofrece evidencia estadística, el presente estudio ha logrado ir más allá, el cual mostró no solo la correlación entre variables cualitativas, sino también, el efecto de manera causal de los determinantes ambientales sobre otra variable, en este caso fisiológicas o infección natural, y el riesgo de transmisión, o la oportunidad de evidenciar momentos fisiológicos (alimentación, desarrollo de huevos) dependiendo de las condiciones ambientales.

5. CONCLUSIONES

1) En las tres veredas muestreadas, el total de insectos del género *Lutzomyia* presenta variación estacional solo en el extradomicilio, siendo diciembre, enero y febrero los meses de mayor abundancia, comportamiento similar únicamente para *L. antunesi* en el extradomicilio.

2) Los principales determinantes ambientales en la abundancia del total de insectos del género *Lutzomyia* en el área de estudio fueron la precipitación del día de la captura con una correlación inversa con la abundancia y la temperatura máxima un 24 horas antes de la captura con una correlación directa.

3) Para *L. antunesi* el principal determinante ambiental de su abundancia fue la precipitación del día de la captura con una correlación inversa, y de las demás especies registradas solo en *L. gomezi* se encontró una correlación directa entre la temperatura máxima del día de la captura y su abundancia en el extradomicilio

4) Para todas las especies con antecedentes vectoriales (*L. antuensi, L. panamensis, L. flaviscutellata, L. gomezi*) se encontró infección con *Leishmania* spp. por la técnica de PCR, principalmente en los meses de mayor abundancia del total de insectos del género *Lutzomyia* (diciembre, enero, febrero).

5) La correlación entre determinantes ambientales y la variación en la abundancia y la infección con *Leishmania* spp. de *L. antunesi* demostraron la importancia de los factores abióticos (T° - Precipitación), los cuales pueden estimular diferentes respuestas biológicas en los posibles vectores.

6. RECOMENDACIONES

1) Los meses en los cuales se deben fortalecer la vigilancia epidemiológica y entomológica de la LC en el área rural de municipio de Villavicencio son: diciembre, enero y febrero (meses de menor precipitación y temperaturas elevadas) y abril agosto, que corresponden a los meses de transición entre el aumento o disminución de la precipitación.

2) Realizar estudios con registro de las variables climáticas *in situ* durante rangos de tiempo prolongados (algunos meses completos durante 2 años) que permitan identificar un modelo predictivo para la variación de la abundancia de *L. antunesi* dependiente de la precipitación y la temperatura en la zona rural de Villavicencio.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alexander B, Ferro C, Young DG, Morales A, Tesh RB. Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in northeastern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87(3):387-95.

Antunes PCA. Informe sobre una investigación realizada en Colombia. Rev Fac Med Bogotá Colombia. 1937;6:3-29.

Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and Identification of *Leishmania* DNA within Naturally Infected Sand Flies by Seminested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. Appl Environmental Microbiol 2000;66:1933–8.

Ashford RW. Leishmaniasis Reservoirs and Their Significance in Control. Clin Dermatol. 1996; 14 (5): 523-32.

Ashford RW. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol 2000;30:1269-81

Awasthi A, Kumar MR, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. Indian J Med Res 2004;119:238-58.

Barreto M, Burbano ME, Barreto P. *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) from middle and lower Putumayo Department, Colombia, with new records to the country. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(5):633-9.

Bejarano EE, Duque P, Vélez ID. Taxonomy and distribution of the series *pia* of the *Lutzomyia verrucarum* group (Diptera: Psychodidae), with a description of *Lutzomyia emberai* n. sp. J Med Entomol. 2004;41:833-41.

Bejarano EE, Castro M, Pérez-Doria A, Hernández-Oviedo E, Vélez A, Vélez ID. Primer Informe de *Lutzomyia* França en el Departamento de Guainía, Amazonia Colombiana, y de *Brumptomyia mesai* Sherlock (Diptera:Psychodidae) en el Litoral Caribe Colombiano. Neotrop Entomol. 2007;36(6):990-993.

Braga RR, Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil. XXII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz &

Neiva, 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarém, Pará State. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986;80(1):143-5.

Cabrera OL, Mosquera L, Santamaría E, Ferro C. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) del departamento de Guaviare, Colombia, con nuevos registros para el país. Biomédica. 2009;29(1):73-86.

Cabrera OL, Munstermann LE, Cardenas R, Ferro C. PCR para l Confirmación de transmisión de *Leishmania Chagas* a hámster sano por picadura de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). Biomédica. 2003;23:239-44.

Cabrera OL, Munstermann LE, Cárdenas R, Gutiérrez R, Ferro C. Definición de las condiciones de temperatura y almacenamiento adecuadas en la detección de ADN de *Leishmania* por PCR en flebotominos. Biomédica 2002;22:296-302.

Carvajal P.L. Factores Bióticos y Abióticos que definen parcialmente la abundancia de *Lutzomyia longiflocosa*, Vector de leishmaniasis cutánea en el Municipio de Tello, Huila. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. 2008.

Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. Review, The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. Cad Saúde Pub 2000;16(4)925-950.

De Almedia MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. *Leishmania* infection: analysis of its first steps. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003;98:861-70.

De Bruijn MHL, Barker DC. Diagnosis of new World Leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of Kinetoplast DNA. Acta Trop. 1992;52 :45-58.

Dedet JP. Répartition géographique des leishmanioses. Med Mal Infect. 2001;31:178-83.

Feliciangeli DM. Ecology of sandflies (Diptera:Spychodidae) in a restricte focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela. IV Sandfly monthly fluctuation and leishmaniasis incidence relationship. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1987; 82(2): 177-79.

Feliciangeli MD. Hourly activity of *Lutzomyia ovallesi* and *L. gomezi* (Diptera:Psychodidae), Vectors of cutaneous leishmaniasis in northcentral Venezuela. J Med Entomol. 1997;34(2):110-5.

Feliciangeli MD, Rabinovich J. Abundance of *Lutzomyia ovallesi* but not *L. gomezi* (Diptera: Psychodidae) correlated with cutaneous leishmaniasis incidente in north-central Venezuela. Med Vet Entomol. 1998 Apr;12(2):121-31.

Ferro C, Pardo R, Díaz A, Pérez L, Munstermann L. Composición de la fauna de flebotomíneos, género Lutzomyia, de la periferia de la ciudad de Leticia, Amazonas, Colombia Colombia. Congreso Internacional Investigación y Salud, INS 80 años 1917-1997. Biomédica. 1997;17.Supl 1:84-85.

Ferro C, Morales A Flebótomos de Colombia: Estudios realizados por el laboratorio de Entomología 1965-1997, En: Toto G, Hernández CA, Raad J, editores. Instituto Nacional de Salud 1917-1997 Una historia, un compromiso. 1998. pp 219-33.

Flórez M, Martínez JP, Gutiérrez R, Luna KP, Serrano VH, Ferro C, Angulo VM, Sandoval CM. [Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) at a suburban focus of visceral leishmaniasis in the Chicamocha Canyon, Santander, Colombia]. Biomédica. 2006;26 (Sup. l) 1:109-20.

González R, De Sousa L, Devera R, Jorquera A, Ledezma E. Seasonal and nocturnal domiciliary human landing/biting behaviour of *Lutzomyia (Lutzomyia) evansi* and *Lutzomyia (Psychodopygus) panamensis* (Diptera; Psychodidae) in a periurban area of a city on the Caribbean coast of eastern Venezuela (Barcelona; Anzoátegui State). Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999; 93(4):361-4.

González R, Devera R. Fauna flebotomínica (Díptera, Psychodidae, Phlebotominae) do Estado Bolívar, Venezuela. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1999;32(6):721-723.

Greene, C E. Enfermedades infecciosas de perros y gatos. Ed. Interamericana Mc Graw-Hill. México, 1993.

Grimaldi G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic and Distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. Am J Trop Med Hyg. 1989; 41(6):687-725.

Golczer G, Arrivillaga J. Modificación de un protocolo estándar de extracción de ADN para flebotominos pequeños (Phlebotominae: *Lutzomyia*). Revista Colombiana de Entomología. 2008; 34(2):199-202.

Holdrige LR. 1967. Life zone ecology. San Jose, Costa Rica: Tropical Science Center, 206p.

Jaramillo C, Travi BL, Montoya J. Vector competence of some neotropical sandflies for the *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex. Med Vet Entomol. 1994; 8(1):1-7.

Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, Barroso PA, Gomez EA, Mimori T, Korenaga M, Iwata H, Nonaka S, Hashiguchi Y. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 2005; 72(1):87-93.

King RJ, Campbell-Lendrum DH, Davies CR. Predicting Geographic Variation in Cutaneous Leishmaniasis, Colombia. Emerging Infectious Diseases 2004; 10:598-606.

Kreutzer RD, Corredor A, Grimaldi G, Grogl M, Rowton ED, Young DG, Morales A, McMahon-Pratt D, Guzman H, Tesh RB. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. American Journal of Tropical Medicine and Higiene. 1991.44:662-675.

Killick-Kendrick R. Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sandflies. Acta Tropica. 35: 297-313. 1978.

Killick-Kendrick R. Phlebotomus vector of the leishmaniasis: a rewiew. Med. Vet. Entomology. 4: 1-24. 1990

Lane RP. 1993. Sand flies (Phlebotominae). *In* Médical Insects and Arachnids (eds. R.P. Lane RP, and Crosskey RW). Chapman and Hall, London, pp. 78-119.

Le Pont F, Pajot F.X. La leishmaniose en Guyane francaise. 1. Etude de lécologie et du taux dínfection naturelle du vecteur *Lutzomyia (Nyssomyia) Umbratilis* Ward et fraiha, 1977 en saison seche. Considérations épidémiologiques. Ent Med et Parasitol. 1980; 18(4):358-382.

Le Pont F, Desjeux P. Leishmaniasis in Bolivia. I. Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) as the vector of visceral leishmaniasis in Los Yungas. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1985;79(2):227-31.

Le Pont F, Leon R, Guerrini F, Gantier JC, Mouchet J, Echeverria R, Guderian RH 1994. Leishmaniasis in Ecuador. 3. *Lutzomyia trapidoi*, vector of *L. panamensis*. Ann Soc Belg Med Trop 74: 23-28.

Marín D, Ferro C, Munstermann L, Téllez J, Pérez M, Vallejo G, Ocampo C. Abundancia estacional e infección natural de *Lutzomyia longiflocosa* (Díptera:Psychodidae) en un foco doméstico de

leishmaniasis cutánea en Chaparral, Tolima. Memorias. XIV Congreso Colombiana de Parasicología y Medicina Tropical. X Simposio PECET. Biomédica. 2009; 29(Supl.): 281-309.

Maroli M, Feliciangeli D, Arias J. Métodos de captura, conservación y montaje de los flebotomos (Diptera: Psychodidea). OPS. 1997; pág. 1-67.

Memmott J. Sandfly distribution and abundance in a tropical rain forest. Med Vet Entomol. 1991;5(4):403-11.

Mendoza Morales A. Colombia: Ordenamiento Territorial [Internet]. Disponible en: http://www.sogeocol.edu.co/documentos/01col.pdf). Consultado: Julio 2008.

Mimori T, Matsumoto T, Calvopiña MH, Gomez EA, Saya H, Katakura K, Nonaka S, Shamsuzzaman SM, Hashiguchi Y. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. Acta Trop 2002;81:197-202.

Miranda A, Carrasco R, Paz H, Pascale JM, Samudio F, Saldaña A, Santamaría G, Mendoza Y, Calzada JE. Molecular epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in Panama. Am J Trop Med Hyg. 2009;81(4):565-71.

Molina JA, Ortiz MI, Guhl F. Seasonality of *Lutzomyia fairtigi* (Diptera:Psychodidae: Phlebotominae), a species endemic to Eastern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(5):477-82.

Montoya J, Ferro C. 1999. Flebotómos (Diptera: Psychodidade) de Colombia. En: amat G., Andrade MG., Fernandez F. Insectos de Colmbia VII. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Física y naturales. Colección Jorge Álvarez lleras. No. 13. Bogotá.

Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD, Barazarte R, Travi BL, Lane RP. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *L. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. Acta Trop. 2003;85(1):19-29.

Montoya-Lerma J, Ferro C. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. pp. 211-245. En: G. Amat, M. G. Andrade y F. Fernández (Eds.). Insectos de Colombia. Volumen II. Colección Jorge Álvarez Lleras, No. 13. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; 1998.

Morales A, Corredor A, Cáceres E, Ibagos L, Rodriguez C. Aislamiento de tres cepas de *Leishmania* a partir de *Lutzomyia trapidoi* en Colombia. Biomédica. 1981;(1):198-207.

Morrison AC, Ferro C, Pardo R, Torres M, Wilson ML, Tesh RB. Nocturnal activity patterns of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. J Med Entomol. 1995a; 32(5):605-17.

Morrison AC, Munstermann LE, Ferro C, Pardo R, Torres M. Ecological and genetic studies of *Lutzomyia longipalpis* in a central Colombia focus of visceral leishmaniasis. Bol. Dir. Malariol y San. Amb. 1995b;35(Sup. 1). 235-248.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2000). *Leishmania*/HIV co-infection in south-western Europe 1990-1998: retrospective analysis of 965 cases. WHO/LEISH/2000.42. OMS, Ginebra, 12 págs. Disponible http://www.who.int/emcdocuments/Leishmaniasis/docs/wholeish200042.pdf.

Ovalle CE, Porras L, Rey M, Ríos M, Camargo YC. Geographic distribution of Leishmania species isolated from patients at the National Institute of Dermatology Federico Lleras Acosta E.S.E., 1995-2005. Biomédica. 2006;26 Suppl 1:145-51.

Porter, C.H, Defoliart, G.R. The manbiting activity of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a tropical wet forest environment in Colombia. Arquivos de Zoologia. 1981; 30:1-158.

Rangel EF, Travi BL, Barbosa AF, Montoya J. Development of Colombian isolates of *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Le. (V.) guyanensis* and *Le. (V.) braziliensis* in the sandfly *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) under experimental conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1993; 88(4):513-5.

Ribeiro AL, Missawa NA, Zeilhofer P. Distribution of phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae) of médical importance in Mato Grosso State, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 2007;49(5):317-321.

Rodríguez N, Aguilar CM, Barrios A, Barrer DC. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sand flies by the polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999;93:47-9.

Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Cupolillo E, Bentin Toaldo C, Macêdo VO, Fernandes O. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania (Viannia) guyanensis. Acta Trop. 2001.22;79(3):225-9.

Rotureau B, Ravel C, Nacher M, Couppié P, Curtet I, Dedet JP, Carme B. Molecular epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in French Guiana. J Clin Microbiol. 2006;44(2):468-73

Rowton ED, de Mata M, Rizzo N, Porter CH, Navin TR. Isolation of *Leishmania braziliensis* from *Lutzomyia ovallesi* (Diptera:Psychodidae) in Guatemala. Am J Trop Med Hyg. 1992;46(4):465-8.

Ryan L., Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ. Leishmanial infections in *Lutzomyia longipalpis and L. antunesi* (Diptera: Psychodidae) on the island of Marajó, Pará State, Brazil. Trans Royal Soc Trop Med and Hyg 1984;78:547-8.

Santos da Silva PE, Alves de Freitas R, Ferreira da Silva D, Alencar RB. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de uma reserva de campina no Estado do Amazonas, e sua importância epidemiológica. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2011;43(1):78-81.

Sandoval CM, Gutiérrez R, Cárdenas R, Ferro C. Species of Lutzomyia (Psychodidae, Phlebotominae) in endemic cutaneous and visceral leishmaniasis foci of the department of Santander, in the eastern range of the Colombian Andes. Biomédica. 2006 Oct;26 Suppl 1:218-27.

Santamaria E. Definición de las especies de Lutzomyia involucradas en la transmisión de leishmaniasis cutánea en los municipios de Otanche y Pauna, Boyacá. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia, 2004.

Santamaría E, Ponce N, Zipa Y y Ferro C. Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania (Viannia) panamensis* en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia. Biomédica 2006; 26(supl.1):82-94.

Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama I, Valencia AZ, Escorcia B, McMahon-Pratt. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania Viannia* in Colombia. Am J Trop Med Hyg 2002;66(6):738-44.

Saravia NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania* (*Viannia*) in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1998;59(1):86-94

Souza NA, Andrade-Coelho CA, Vilela ML, Peixoto AA, Rangel EF. Seasonality of Lutzomyia intermedia and Lutzomyia whitmani (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), occurring sympatrically in area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(6):759-65.

Tesh RB, Guzman H. Sandflies and the agents they transmit. En: The biology of disease vectors. University Press of Colorado. 1996:117-27.

Travi BL, Montoya J, Solarte Y, Lozano L, Jaramillo C. leishmaniasis in Colombia. I. studies on the Phlebotomine fauna associated with endemic foci in the pacific coast región. Am J Trop Med Hyg 1988;39:261-6.

Travi BL, Vélez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C, Montoya J. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990;84(5):676-7.

Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramillo C, Llano R, Vélez ID. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. J Med Entomol. 1996;33(3):278-85.

Travi BL, Adler GH, Lozano M, Cadena H, Montoya-Lerma J. Impact of habitat degradation on phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. J Med Entomol. 2002;39(3):451-6.

Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. Parasicología Veterinarian. Editorial acribia. 2001, España. Pag: 168-9, 250-2.

Vásquez-Trujillo A. Registro de leishmaniasis cutánea en caninos presentes en zonas periurbana de Villavicencio, Meta y su importancia en la salud pública. Rev Orinoquia. 2006; 10(2):79-84.

Vásquez-Trujillo A, Santamaría-Herreño E, González-Reina AE, Buitrago-Alvarez LS, Góngora-Orjuela A, Cabrera-Quintero OL. *Lutzomyia antunesi* as suspected vector of cutaneous leishmaniasis in the Orinoquian region of Colombia. Rev Salud Pública. 2008;10(4):625-32.

Vélez ID, Hendrickx E, Robledo S, Agudelo S. Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. Cad Saúde Pública 2001;17(1):171-80.

Wolff M, Sierra D, Murcia LM, Vélez ID. Phlebotominae Fauna (Diptera: Psychodidae) in the Department of Amazonas, Colombia. Neotropical Entomology. 2003; 32(3):523-6

Young DG, Duncan M. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the west indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Am Entomol inst 1994;54:1-881.

Young DG, Lawyer PG. New World vectors of the leishmaniasis. In: Harris KF, editor. Current tropics in vector research. 1987.Vol 4. New Cork: Springer-Verlag.

Young DG, Morales A, Kreutzer RD, Alexander JB, Corredor A, Tesh RB, Ferro de Carrasquilla C, & de Rodríguez, C, 1987. Isolation of Leishmania braziliensis (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from cryopreserved Colombian sandflies (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 24: 587-9.

ANEXOS

Anexo 1. Ensayo de determinación de la altura para la trampa CDC en el extradomicilio.

Se realizó un muestreo por tres noches consecutivas con el objetivo de evaluar la altura en la cual se realizó el muestreo en la zona de estudio, se evaluaron tres alturas diferentes, 30 cm, 1,5 m, y el dosel del bosque aproximadamente a 5 m., con tres replicas por altura. Para determinar la diferencia entre los tres promedios se utilizo una prueba no paramétrica de comparación de muestras independientes de U Mann-Whitney. Los resultados de abundancia en tres alturas para las trampas de luz tipo CDC, mostraron que entre 1,5 m y 5 m (dosel del bosque) no se presentan diferencia significativas (P=0,275), mientras que la altura de 30 cm si presento diferencia con las otras dos alturas (P=0,05) mostrando una media de captura menor a las otras dos, por lo tanto se determino la utilización de 1,5 m para la realización del muestreo estacional, con el fin de que la altura del la trampa fuera igual a la utilizada tanto en el intradomicilio y peridomicilio, como en otras investigaciones realizadas a nivel nacional.

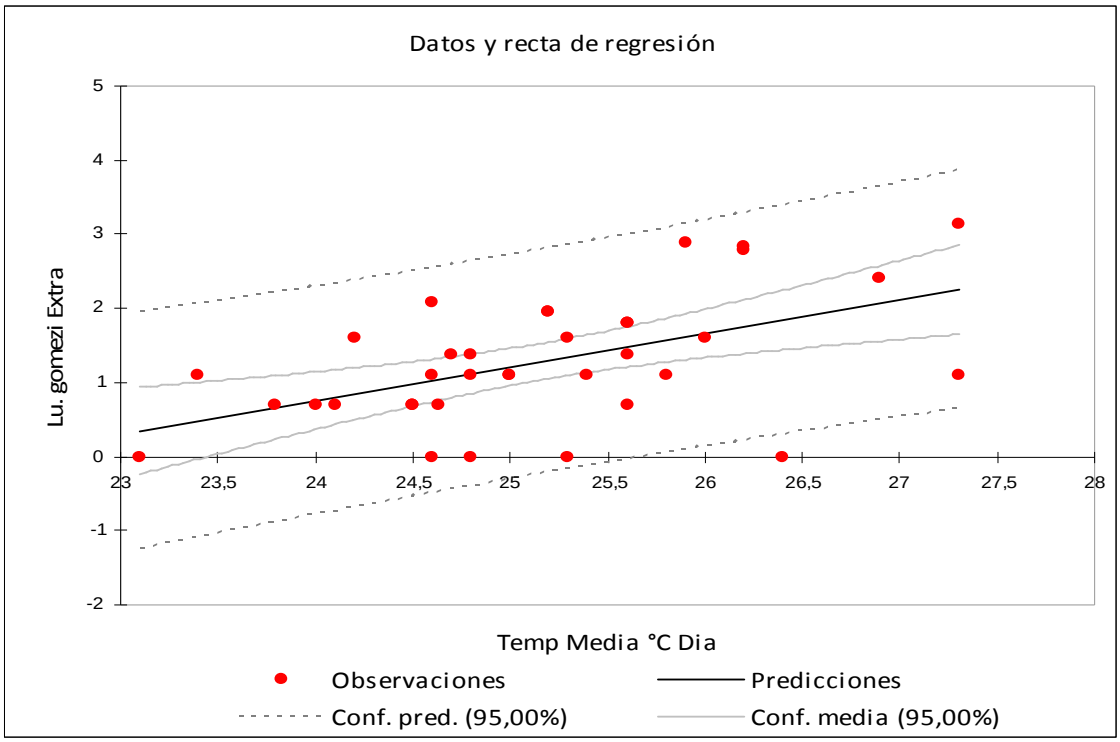
Medidas de posición y dispersión para cada una de las alturas a evaluar

Muestra	Frecuencia	Media	Varianza	Desviación típica	Mínimo	Mediana	Máximo
5 m	3	213	12592	112,2	97,0	221,0	321,0
1,5 m	3	145,6	17292,3	131,5	52,0	89,0	296,0
0,3 m	3	26,6	54,3	7,4	21,0	24,0	35,0

Prueba de comparación de muestras independientes de U Mann-Whitney para las tres alturas de muestreo

Comparación	U	Z (valor observado)	Z (valor crítico)	P bilateral	Alpha
5 m - 1,5 m	7,0	1,091	1,960	0,275	0,05
1,5 m - 0,3 m	9,0	1,964	1,960	0,050	0,05
5 m – 0,3 m	9,0	1,964	1,960	0,050	0,05

Anexo 2. Modelo de regresión lineal y calidad del modelo de *L. gomezi* extradomiciliar y la temperatura media en °C del día de la recolección.



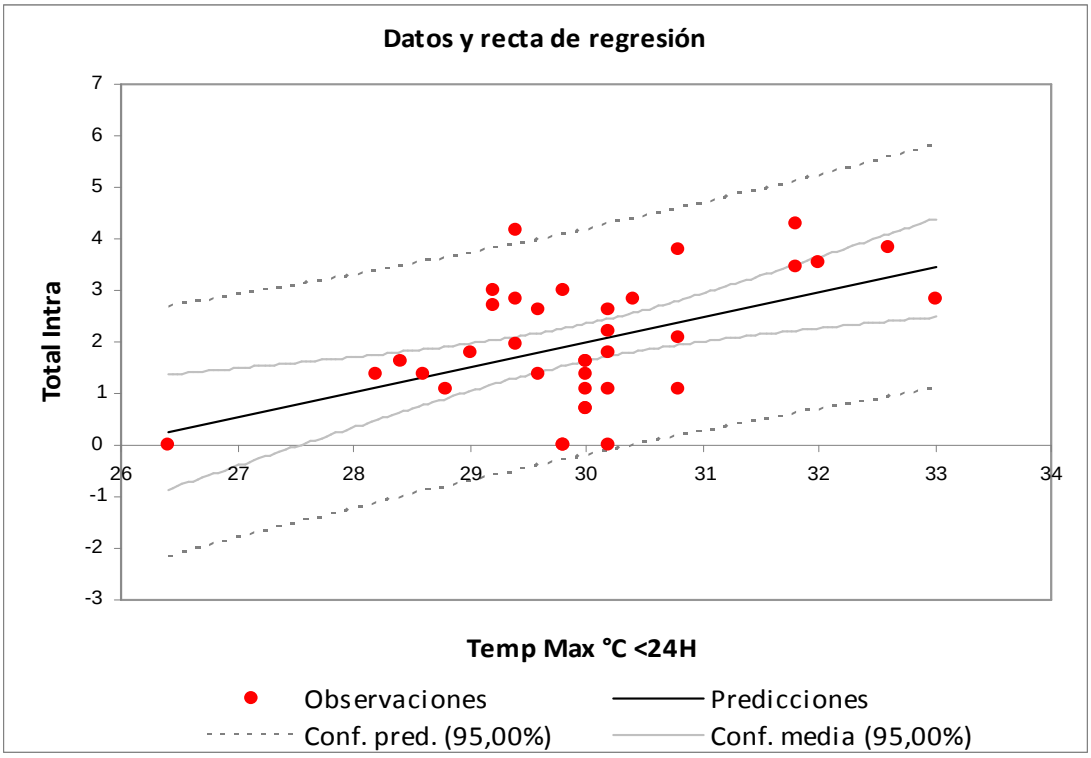
Modelo de regresión lineal

Calidad del modelo

Fuente	GDL	Suma los cuadrados	Cuadrado medio	F de Fisher	Pr > F
Modelo	1	6,908	6,908	12,840	0,001
Residuos	34	18,293	0,538		
Total	35	25,201			

Ecuación del modelo: *L. gomezi* Extra = -10,10153681769 + 0,4524276654069*Temp Media °C Dia

Anexo 3. Modelo de regresión lineal y calidad del modelo entre el total de *Lutzomyia* capturadas en el intradomicilio y la temperatura máxima en °C 24 horas antes de la recolección.

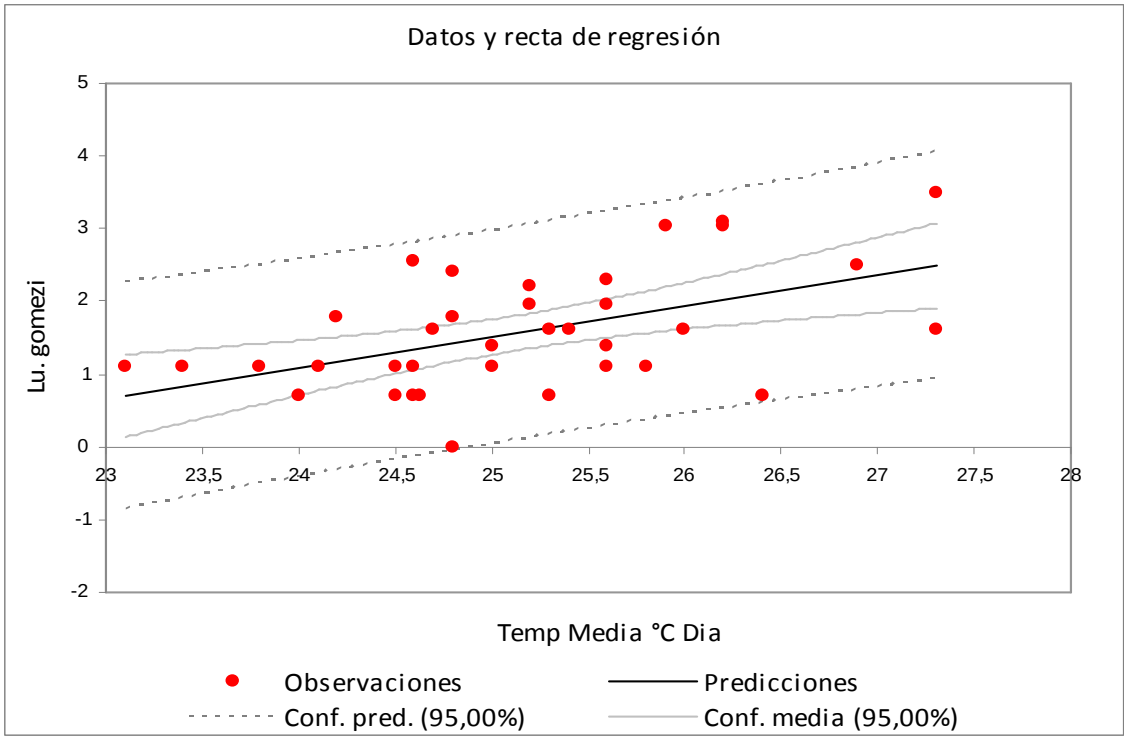


Modelo de regresión lineal

Calidad del modelo

Fuente	GDL	Suma los cuadrados	Cuadrado medio	F de Fisher	Pr > F
Modelo	1	12,703	12,703	11,230	0,002
Residuos	34	38,459	1,131		
Total	35	51,162			
Ecuación del modelo: Exp(Total Intra) = -12,49447690411 + 0,4828924647506*Temp Max °C <24H					

Anexo 4. Modelo de regresión lineal y calidad del modelo del total de *L. gomezi* capturadas y la temperatura media en °C del día de la recolección.



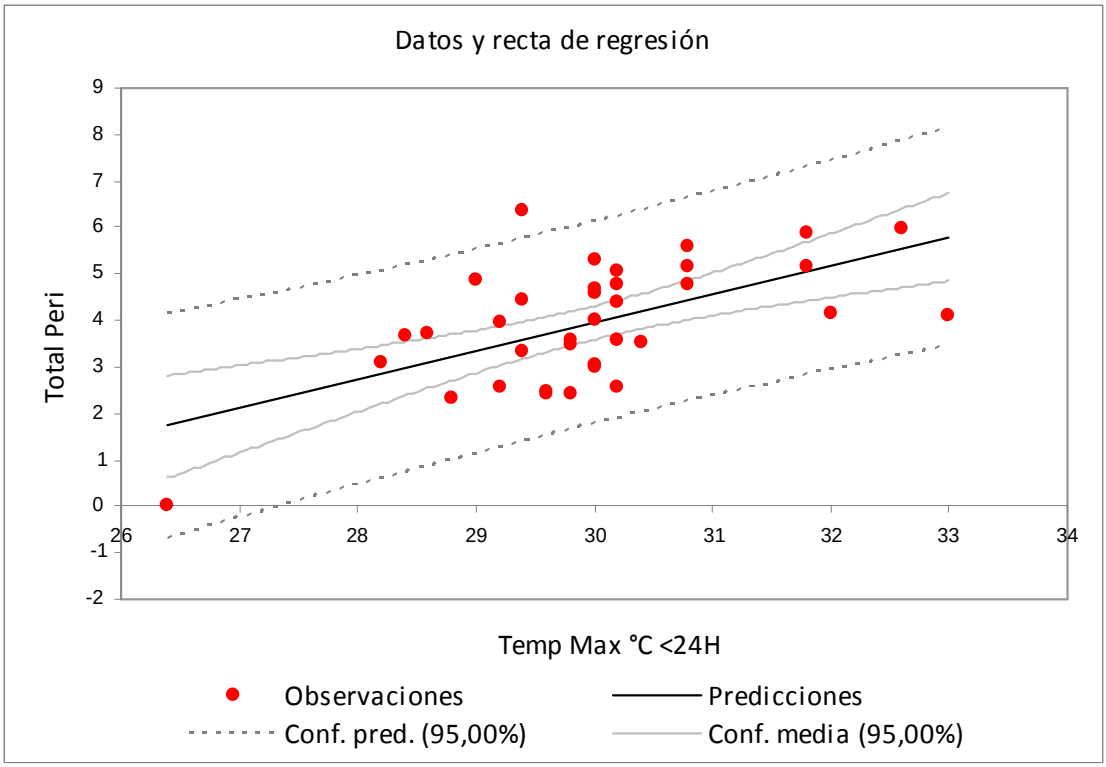
Modelo de regresión lineal

Calidad del modelo

Fuente	GDL	Suma los cuadrados	Cuadrado medio	F de Fisher	Pr > F
Modelo	1	6,103	6,103	12,034	0,001
Residuos	34	17,242	0,507		
Total	35	23,345			

Ecuación del modelo: *L. gomezi* = -9,11845928118048 + 0,425231752084043*Temp Media °C Dia

Anexo 5. Modelo de regresión lineal y calidad del modelo del total de insectos del género *Lutzomyia* capturadas en el peridomicilio y la temperatura máxima en °C 24 horas antes de la recolección.



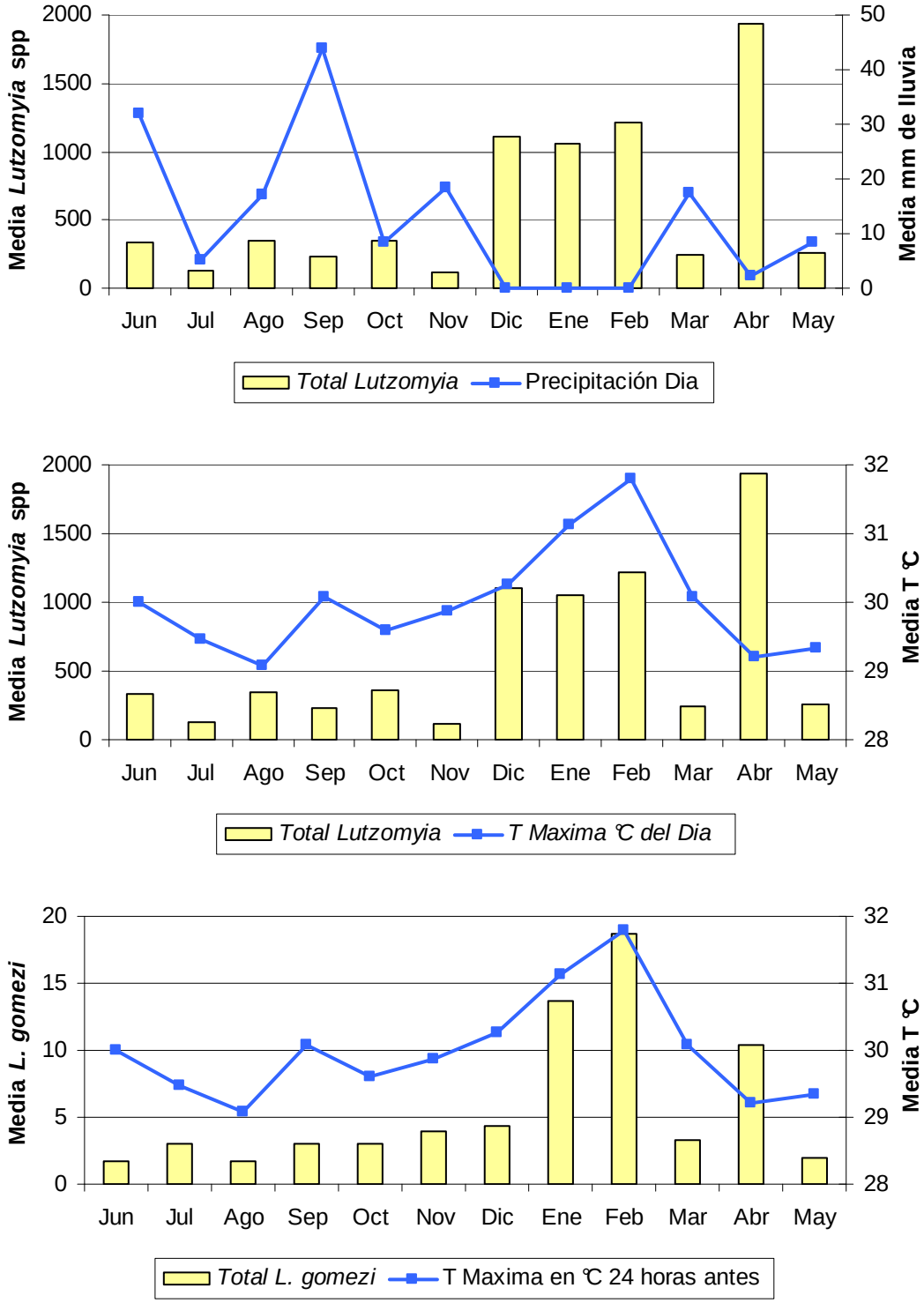
Modelo de regresión lineal

Calidad del modelo

Fuente	GDL	Suma los cuadrados	Cuadrado medio	F de Fisher	Pr > F
Modelo	1	20,759	20,759	18,657	0,0001
Residuos	34	37,830	1,113		
Total	35	58,589			
Ecuación del modelo: Total Peri = -14,5722928434395 + 0,617304157780672*Temp Max °C <24H					

Anexo 6. Descripción de características fisiológicas presentes en los grupos de hembras de *Lutzomyia* positivas a la PCR

Código	Especie	*Lutzomyia* por Grupo	Zona	Huevos	Huevos y Sangre
66	*L. antunesi*	2	Intra	-----	-----
86	*L. panamensis*	4	Peri	-----	-----
88	*L. flaviscutellata*	2	Extra	-----	-----
99	*L. panamensis*	2	Extra	-----	-----
212	*L. flaviscutellata*	2	Extra	-----	-----
213	*L. antunesi*	3	Intra	-----	2
214	*L. gomezi*	1	Intra	-----	-----
215	*L. antunesi*	3	Peri	-----	1
216	*L. gomezi*	1	Peri	-----	-----
217	*L. panamensis*	1	Peri	-----	-----
221	*L. antunesi*	1	Extra	-----	-----
222	*L. antunesi*	1	Intra	-----	-----
228	*L. gomezi*	2	Extra	-----	1
229	*L. flaviscutellata*	1	Extra	-----	-----
231	*L. panamensis*	1	Peri	-----	-----
233	*L. flaviscutellata*	1	Extra	-----	-----
291	*L. panamensis*	3	Extra	-----	-----
295	*L. antunesi*	5	Peri	2	1
314	*L. gomezi*	2	Extra	-----	1
317	*L. panamensis*	1	Extra	1	-----
318	*L. flaviscutellata*	1	Extra	-----	-----
343	*L. gomezi*	1	Peri	1	-----
345	*L. panamensis*	3	Peri	1	-----
348	*L. antunesi*	30	Extra	30	-----
351	*L. flaviscutellata*	1	Extra	-----	-----
365	*L. gomezi*	2	Extra	1	-----
366	*L. antunesi*	30	Intra	-----	-----
377	*L. antunesi*	15	Intra	4	2
448	*L. flaviscutellata*	3	Extra	-----	-----
508	*L. antunesi*	2	Peri	-----	-----
652	*L. antunesi*	3	Peri	-----	1



Anexo 7. Patrón de abundancia mensual del total de insectos del género *Lutzomyia* en la zona endémica, y para *L. gomezi* asociada a los principales determinares ambientales para cada caso