



**Caracterización de los sitios de cría naturales de
Lutzomyia evansi (Diptera: Psychodidae) en ambientes
periurbanos del municipio de Ovejas, Sucre - Colombia**

LUIS GREGORIO ESTRADA MÉNDEZ, Biólogo

**Trabajo de grado para optar el título de Magíster en
Biología**

**Tutor:
Ph.D. EDUAR ELIAS BEJARANO**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS**

Sincelejo

2017

Notas de aceptación:

Firma de presidente del jurado

Firma del jurado 2

Firma del jurado 3

Dedicatoria

A Dios

A mis papás, Martha Lucia y Uriel Enrique

A mis hermanos, Martha L. y Cristo J.

A mis sobrinos, Mélany y Adrián

A mi Thomas

A mi tía Libia

A mis familiares y amigos

A mis compañeros de trabajo

*A la memoria de:
Leonard Narváez, 1984 – 2015
Amigo y Hermano*

“La tristeza y la soledad siempre han sido mi compañía y mi inspiración al escribir, la felicidad solo ha sido una consecuencia de mi esfuerzo” Ige

Agradecimientos

A Dios

A mis compañeros de estudios de la maestría por todos los buenos momentos compartidos durante el proceso de formación.

A mis profesores por la formación impartida y los consejos para ser un buen profesional y mejor persona.

A mi tutor Eduar Elías Bejarano por seguir confiando en mis actitudes como Biólogo – Investigador.

A Horacio Cadena por el aprendizaje que he adquirido durante mi proceso de ejecución del proyecto, el apoyo y la confianza.

A Rafael J. Vivero por compartir experiencias y por su profesionalismo.

A Luz Adriana Acosta, María Angélica Contreras y Andrés Vélez por su valioso aporte al trabajo de campo y de laboratorio.

A nuestro ayudante en campo Carlos Narváz ‘El Vaca’.

A Edgar Ortega por su compromiso con la investigación y sus aportes.

A Pedro Blanco por su total colaboración en la disponibilidad del laboratorio.

A Alveiro Pérez, Luis Enrique Paternina, Fernando Flórez y Jorge Luis Rodríguez por sus consejos y sus aportes a la investigación.

Al Grupo de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre.

Al Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales *-PECET*, de la Universidad de Antioquia.

Al consorcio Estrategia Integral para el Control de la Leishmaniasis en Colombia.

A Colciencias.

A la comunidad de los barrios El Tolima, El Oasis, 4 de octubre, La Pradera, ciudadela Villa Paz y San José del municipio de Ovejas.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ESTADO DEL ARTE.....	18
2. 1 Epidemiología de las Leishmaniasis	18
2.2 Los flebotomíneos y su importancia médica	19
2.3 Biología y ciclo de vida de especies del género <i>Lutzomyia</i>	21
2.3.1 Estadios inmaduros.....	23
2.3.2 Estadios Adultos.....	25
2.4 Sitios de cría naturales de especies del género <i>Lutzomyia</i> en el Neotrópico	27
2.4.1 Sitios de cría naturales en ambientes selváticos.	27
2.4.2 Sitios de cría naturales en ambientes rurales.	29
2.4.3 Sitios de cría naturales en ambientes periurbanos y urbanos	30
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo general	33
3.2 Objetivos específicos	33
4. METODOLOGÍA	34
4. 1 Área de estudio	34
4.2 Criterios de selección de los barrios donde se realizaron los muestreos	35
4.3 Búsqueda de sitios de cría naturales para inmaduros de <i>Lu. evansi</i> y recolección de muestras de suelo	35
4.4 Detección de formas inmaduras de <i>Lu. evansi</i>.....	37
4.4.1 Búsqueda directa en estéreo microscopio de larvas, pupas y exuvias, y cría y mantenimiento de estadios inmaduros	37

4.4.2 Recuperación de adultos emergidos por medio de incubación de muestras de suelo.	39
4.5 Identificación taxonómica de inmaduros del género <i>Lutzomyia</i> y flebotomíneos adultos emergidos.	40
4.6 Descripción de la vegetación asociada a los sitios de cría naturales de <i>Lu. evansi</i> en el área periurbana de Ovejas.....	42
4.7 Caracterización ambiental y fisicoquímica de los sitios de cría de las formas inmaduras de <i>Lu. evansi</i>	42
4.8 Análisis de los datos	43
5. RESULTADOS	45
5.1. Identificación de los sitios de cría naturales de inmaduros de <i>Lu. evansi</i> en el área periurbana del municipio de Ovejas	45
5.2. Descripción de la vegetación asociada a los sitios de cría naturales de <i>Lu. evansi</i> en el área periurbana de Ovejas.....	50
5.3. Condiciones físicas y químicas del suelo asociado a los sitios de cría naturales de los estados inmaduros de <i>Lu. evansi</i> en el área periurbana de Ovejas.....	55
6. DISCUSIÓN	61
7. CONCLUSIONES.....	71
8. RECOMENDACIONES	72
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
10. ANEXOS.....	88

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Morfología de los parásitos de <i>Leishmania</i> agentes causales de las diversas formas de las leishmaniasis. a). Amastigote, de forma ovalada sin flagelo y localizado dentro de los macrófagos del huésped vertebrado. b). Promastigote, de forma alargada con flagelo que le confiere movimiento y localizado en el tracto digestivo de los insectos vectores.....	19
Figura 2. <i>Lutzomyia</i> sp., tomando una ingesta sanguínea.....	21
Figura 3. Ciclo de vida de las especies del género <i>Lutzomyia</i> . 1) Estadio adulto; 2) estadio de huevo; 3) estadio de larva: a-. Instar I, b-. Instar II, c-. Instar III y d-. Instar IV; y 4) Estadio de pupa.....	23
Figura 4. Características morfológicas de larvas y pupas de especies del género <i>Lutzomyia</i>	24
Figura 5. Caracteres morfológicos usados en la identificación taxonómica de los estadios adultos de <i>Lutzomyia</i> . A) Cabeza; B) Tórax; C) Ala; D) Abdomen; E) Segmentos abdominales en hembras; F) Horquilla Genital; G) Espermateca; H) Genitalia de Machos; I) Bomba y filamentos genitales	26
Figura 6. Ubicación geográfica del municipio de Ovejas en el departamento de Sucre y de los barrios donde fueron realizados los muestreos	34
Figura 7. Microhábitats explorados para la búsqueda de sitios de cría naturales y recolección de suelo. a) Corrales para animales domésticos, b) Base de árboles, c) Árboles caídos, d) Orilla de paredes en bahareque, e) Hojarasca de árboles y f) Desechos al exterior de las viviendas.....	37
Figura 8. Recuperación de estadios inmaduros a partir de muestras de suelo recolectadas en el municipio de Ovejas. a) Búsqueda directa bajo estéreomicroscopio y b) Cría y mantenimiento de larvas y pupas recuperadas en condiciones de laboratorio hasta el estadio adulto.....	38
Figura 9. Incubación de muestras de suelo para la recuperación de adultos emergidos de <i>Lu. evansi</i>	40
Figura 10. Frecuencia de estadios inmaduros recuperados que completaron su ciclo de vida hasta la fase adulta bajo condiciones de laboratorio	47

- Figura 11.** Estadios inmaduros de *Lu. evansi* recuperados en sitios de cría naturales. (a) larva de instar III donde se aprecian (flechas) las setas caudales, la cabeza y las cerdas en forma de mazos en todo el cuerpo. (b) larva de instar IV que denota la presencia de las cuatro setas caudales y la placa tergal esclerotizada. (c) pupas con vista frontal y lateral donde se observan los ojos, el par de alas y los segmentos en forma de anillos del abdomen..... 48
- Figura 12.** Distribución espacial de los sitios de cría naturales de *Lu. evansi* (puntos verdes) y otras especies de *Lutzomyia* (puntos azules) y de microhábitats donde no se hallaron inmaduros (puntos rojos) en los barrios: a) 4 de octubre, El Tolima y El Oasis, b) La Pradera y ciudadela Villa Paz, y c) barrio San José 50
- Figura 13.** Especies vegetales donde se identificaron sitios de cría naturales de *Lu. evansi* en el área periurbana de Ovejas. a) Base de los árboles de *Cordia dentata* (Uvito), b) *Astronium graveolens* (Santa Cruz) y c) *Guazuma ulmifolia* (Guácimo) 53
- Figura 14.** Análisis de componentes principales para las variables físicas y químicas de los suelos de sitios de cría naturales en el área periurbana de Ovejas. (a) relación entre las variables de los sitios de cría naturales de *Lu. evansi*, sitios de otras especies de *Lutzomyia* y microhábitats negativos, (b) gráfica de sedimentación del ACP con valor propicio superior a uno..... 55
- Figura 15.** Relación entre las variables de los suelos analizados en los sitios de cría naturales mediante la prueba de Spearman. (a) Relación Ca/Mg con respecto al número de inmaduros. (b) Variable Limo con respecto al número de inmaduros 57
- Figura 16.** Diagrama de dispersión de los ejes F1 y F2 obtenidos a partir del análisis discriminante para tres grupos de microhábitats naturales (Levansi, Lotras y Lnegativa) con sus centroides, al igual que las elipses de predicción para cada grupo 58
- Figura 17.** Diagrama de cajas entre los promedios de pH (a) y saturación de Magnesio (b) registrados en los sitios de cría naturales de *Lu. evansi* (Levansi), sitios de cría naturales de otras especies de *Lutzomyia* (Lotras) y los microhábitats negativos (Lnegativa) en el área periurbana de Ovejas, Sucre 59

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Microhábitats inspeccionados, número de muestras recolectada y procesadas e inmaduros recuperados en el municipio de Ovejas, durante los años 2013 – 2015	46
Tabla 2. Frecuencia absoluta y relativa de inmaduros de flebotomíneos recolectados en ambientes periurbanos de Ovejas, Sucre, discriminados por especie.	49
Tabla 3. Especies arbóreas y arbustivas donde se hallaron los sitios de cría naturales de <i>Lu. evansi</i> y otras especies de <i>Lutzomyia</i> en el área periurbana del municipio de Ovejas, Sucre, durante los años 2013 – 2015	54
Tabla 4. Contribución (%) de cada variable a los componentes principales (ejes de proyección) en el análisis de componentes principales para los suelos analizados en el área periurbana de Ovejas, Sucre durante los años 2013 – 2015	56
Tabla 5. Clasificación cruzada del análisis discriminante (AD) de los sitios de cría naturales de <i>Lu. evansi</i> , sitios de cría de Lotras y microhábitats Lnegativa en Ovejas, Sucre durante los años 2013 – 2015.....	59
Tabla 6. Análisis de Kruskall Wallis realizado a las variables obtenidas en los sitios de cría naturales identificados y microhábitats negativos en Ovejas, Sucre	60

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Especies vegetales identificadas en los barrios El Tolima, El Oasis, 4 de octubre, La Pradera, ciudadela Villa Paz y San José durante los años 2013 - 2015	88
Anexo 2. Variables ambientales y fisicoquímicas de los sitios de cría naturales de <i>Lu. evansi</i> , de otras especies y de microambientes naturales negativos en Ovejas, utilizados para el análisis estadístico.....	91
Anexo 3. Matriz de correlación de Spearman	92
Anexo 4. Función discriminante de clasificación entre los microhábitats naturales Levansi, Lotras y Lnegativa.....	93

RESUMEN

Las leishmaniasis son enfermedades causadas por parásitos de *Leishmania*, manifestadas bajo tres formas clínicas; leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral. Tradicionalmente éstas se han asociado a ambientes selváticos y rurales, no obstante, algunos factores sociales, económicos y ecológicos han favorecido la aparición de casos autóctonos en ambientes periurbanos y urbanos. El municipio de Ovejas es considerado como el foco principal de leishmaniasis visceral en la Costa Caribe colombiana, donde *Lu. evansi* es el vector de LC y LV, y aun cuando es la especie más abundante poco se sabe de sus sitios de cría naturales. La identificación y caracterización de los sitios de cría es fundamental para establecer medidas de control vectorial en áreas periurbana y urbana donde los casos de leishmaniasis han sido reportados.

Un kilogramo de muestras de suelo fue tomado de alrededor de la base de los árboles, la hojarasca, huecos de árboles, suelo debajo de árboles caídos, corrales para gallinas y cerdos, entre otros microhábitats. Los inmaduros de Phlebotominae fueron recuperados por búsqueda directa bajo estéreomicroscopio. Posteriormente, las muestras de suelo fueron incubadas por 60 días en condiciones controladas de temperatura, luminosidad y humedad relativa en recipientes plásticos hasta la eclosión de las larvas y pupas restantes (para posteriormente realizar determinación taxonómica). Los árboles asociados a cada sitio de cría fueron identificados y las características físicas y químicas de los suelos fueron analizados.

Un total de 616 muestras de suelo fueron recolectadas de 466 potenciales sitios de cría, 422 inmaduros fueron recuperados a partir de 101 muestras recolectadas en la base de los árboles, 1 de hojarasca y 1 de árboles caídos. *Lu. evansi* fue la especie con más inmaduros recuperados (n=222), seguida por *Lu. rangeliana* (n=53), *Lu. c. cayennensis* (n=22), *Lu. atroclavata* (n=21), *Lu. micropyga* (n=12), *Lu. trinidadensis* (n=4), *Lu. dubitans* (n=3), *Lu. gomezi* (n=2) y *Lu. sp* (n=83). Los sitios de cría naturales de *Lu. evansi* se identificaron en la base de los árboles de *Cordia dentata* (n=53), *Astronium graveolens* (n=3), *Guazuma ulmifolia* (n=2), algunos árboles no identificados (n=5); y hojarasca. El análisis de las variables físicas y químicas del suelo indican que éstos se desarrollan en suelos que presentan pH promedio de 7,4, con textura limosa, rica en nutrientes, con buena relación de Calcio-Magnesio, Capacidad de Intercambio Catiónico y saturación de Calcio. La cantidad de inmaduros en un microhábitat estuvo determinada por la textura (limo) y la relación Calcio - Magnesio existente en los suelos.

La identificación de sitios naturales de *Lu. evansi* es registrada por primera vez en el área periurbana de Ovejas, Sucre. La mayoría de los sitios de cría naturales de esta especie fueron hallados asociados con la base del árbol *Cordia dentata*; y la abundancia de inmaduros recuperados está relacionada con algunas condiciones físicas y químicas de los suelos.

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused by *Leishmania* parasites, manifested under three clinical forms: Cutaneous, Visceral and Mucocutaneous leishmaniasis. Traditionally these have been associated with sylvatic and rural environments, nevertheless some social, economic and ecological factors has favor the appearance of autochthonous cases in periurban and urban settlements. The municipality of Ovejas is considered as the main focus of visceral leishmaniasis in the Colombian Caribbean Coast, where *Lutzomyia evansi* is the vector of both CL and VL, and in spite of this insect is the most abundant species little is known about its natural breeding sites. The identification and characterization of natural breeding sites is essential to establish vector control measures in urban and peri-urban areas where leishmaniasis cases are being reported.

One kg of soil samples were taken around base of the tree, leaf litter, tree hollows, soil from coarse woody debris, poultry and pig shelters, among other microhabitats. The immature were recovered by direct search under the stereoscope. Subsequently, these soil samples were incubated for 60 days in plastic pots until hatching of remaining larvae and pupae. The trees associated to each breeding site were identified and physical and chemical characteristics of the soil were analyzed.

A total of 616 soil samples were collected from 466 potential breeding sites. 422 immatures were recovered from 101 samples collected at the base of trees, 1 from at leaf litter and 1 from at coarse woody debris. *Lu. evansi* was the most immature species recovered (n=222), followed by *Lu. rangeliana* (n=53), *Lu. c. cayennensis* (n=22), *Lu. atroclavata* (n=21), *Lu. micropyga* (n=12), *Lu. trinidadensis* (n=4), *Lu. dubitans* (n=3), *Lu. gomezi* (n=2) and *Lu. sp* (n=83). The natural breeding sites of *Lutzomyia evansi* were the base of the tree of *Cordia dentata* (n=53), *Astronium graveolens* (n=3), *Guazuma ulmifolia* (n=2), a few unidentifiable trees (n=5); and leaf litter. The analysis of the physical and chemical variables of the soil indicate that these are developed in soils that have an average pH of 7.4, with silty texture, rich in nutrients, with a good Calcium - Magnesium ratio, Cationic Exchange Capacity, and Calcium saturation. The amount of immature in a microhabitat was determined by the texture (silt) and the Calcium - Magnesium ratio in the soils.

The identification of natural breeding sites of *Lu. evansi* is recorded for the first time in the peri-urban area of Ovejas, Sucre. The most of the natural breeding sites of *Lu. evansi* were found

associated with the base of the *Cordia dentata* tree; and the abundance of immature recovered is related to some physical and chemical conditions of the soils.

1. INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades zoonóticas causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania* (Ross, 1903), que incluye más de 30 especies transmitidas a los humanos por la picadura de una hembra de flebotomíneo. En los humanos las leishmaniasis se manifiestan bajo diversas formas clínicas, entre las cuales la leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis visceral (LV) y leishmaniasis mucocutánea (LMC) son las más comunes en América. Anualmente, dos millones de casos nuevos son reportados en 98 países de cinco continentes, de los cuales 300,000 son de LV y un millón corresponden a LC ([World Health Organization] WHO, 2010; Alvar et al., 2012).

Aunque en las Américas, tradicionalmente las leishmaniasis han estado asociadas a ambientes selváticos y rurales, en los últimos años éstas han venido ocupando nuevos escenarios de transmisión debido a la integración de diferentes factores sociales, económicos y ecológicos (Desjeux, 2001; Coura-Vital et al., 2013). El fenómeno de la urbanización ha conllevado al incremento de casos, con el registro de brotes epidemiológicos cutáneos de la enfermedad en ciudades de Argentina (Salomón et al., 2008), Bolivia (García et al., 2009), Brasil (Oliveira et al., 2008; Carvalho et al., 2010), México (Sánchez-García et al., 2010) y Venezuela (Bonfante-Garrido et al., 1984; Scorza & Rojas, 1990; Cannova et al., 2011). Colombia, después de Brasil es el país americano con más incidencia de casos, con el reporte de 7,900 (7,777 LC, 108 LMC y 15 LV) en el año 2015 y se estima que 10 millones de personas están en riesgo de padecer la enfermedad ([Pan American Health Organization] PAHO, 2014; [Sistema nacional de Vigilancia en Salud Publica/Instituto Nacional de Salud] SIVIGILA/INS, 2015).

No obstante, aun cuando este tipo de enfermedades en nuestro país es endémica en áreas rurales y selváticas, el reciente registro de casos autóctonos periurbanos y urbanos, al igual que la

presencia de animales silvestres y domésticos, se deriva en parte a los cambios ecológicos y demográficos que han favorecido el desarrollo de las poblaciones de los vectores y su contacto con los humanos (Vargas et al., 1990; Ferro et al., 1996; Pardo et al., 1996; Sandoval et al., 1998; Bejarano et al., 2002; Cortes y Fernández, 2008; Vivero et al., 2009; Zambrano-Hernández et al., 2015; Zambrano et al., 2016). En Colombia, solo se han identificado microhábitats que sirven como sitios de cría naturales para muy pocas especies que revisten interés epidemiológico (Ferro et al., 1997; Vivero et al., 2015).

En la costa Caribe colombiana la especie flebotomínea predominante es *Lu. evansi*, la cual ha sido incriminada como el principal vector de los parásitos causantes de las formas cutánea y visceral (Travi et al., 1990; Bejarano et al., 2012). Poco se sabe acerca de los sitios de cría naturales de *Lu. evansi*, los estudios realizados por Vivero et al. (2015) en localidades urbanas de Sincelejo y áreas de la reserva forestal Serranía de Coraza en Colosó, permitieron identificar la existencia de algunos microambientes propicios para el desarrollo de los estadios inmaduros de este vector, sin embargo, a pesar de que es la especie de flebotomíneo más abundante, escasos inmaduros y sitios de cría fueron hallados. La presencia y adaptación de *Lu. evansi* a hábitats domiciliarios en áreas periurbanas y urbanas es muy notable, llegando ser recolectados en grandes cantidades en el interior de las viviendas (Rodríguez et al., 2016). Esto se evidencia en el municipio de Ovejas, considerado como el principal foco de leishmaniasis en el departamento de Sucre, el cual reviste gran interés epidemiológico a nivel nacional por la presencia de casos urbanos de LC y LV.

El conocimiento de la bionomía del principal vector de LC y LV en el municipio de Ovejas, es importante para comprender la dinámica de transmisión de la leishmaniasis en la zona, donde la alta abundancia del vector y la presencia de animales domésticos y silvestres estarían favoreciendo la transmisión de la enfermedad en microfocos peridomiciliarios. Los nuevos

escenarios ambientales indican que para llevar a cabo un control de la enfermedad es necesario tener un conocimiento de los microhábitats que sirven de sitios de cría naturales. Este conocimiento es fundamental para establecer y llevar a cabo medidas de control vectorial en los focos de transmisión periurbanos y urbano de leishmaniasis en Colombia. En esta investigación se presenta una caracterización de los microhábitats que sirven como sitios de cría naturales a los estadios inmaduros de *Lu. evansi* en el área periurbana del municipio de Ovejas, Sucre.

2. ESTADO DEL ARTE

2. 1 Epidemiología de las Leishmaniasis

Entre las más importantes patologías protozoarias emergentes y reemergentes transmitidas por vectores, las leishmaniasis constituyen un complejo de enfermedades endémicas desatendidas, causadas por parásitos protozoarios digénicos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) agrupados en el género *Leishmania* Ross (1903). Estos parásitos pueden adoptar dos formas (Figura 1), amastigote y promastigote, la última de las cuales lleva a cabo su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedador invertebrado (Alvar, 2001). La presencia de la enfermedad está directamente vinculada a la pobreza, pero factores sociales, ambientales y climatológicos también influyen en la epidemiología de ésta. En América, las leishmaniasis se distribuyen desde México hasta Argentina, con la excepción de Chile y Uruguay, pero el 75,8 % de los casos de LC y LMC lo aportan Brasil, Colombia y Perú ([Organización Panamericana de la Salud] OPS, 2016).

En Colombia, la enfermedad no se distribuye homogéneamente, sino que se presenta en forma endémica en zonas geográficas específicas denominadas focos naturales de transmisión donde están presentes los elementos claves del ciclo (vectores y reservorios infectados). Estos incluyen áreas selváticas de la Costa Pacífica y del Amazonas, áreas de bosque seco tropical de la costa Caribe colombiana, áreas de cultivo en la región interandina, áreas de llanuras de la región oriental y áreas desérticas localizadas en la península de La Guajira (Vélez et al., 2001). Seis especies de *Leishmania* causan las tres formas clínicas de la enfermedad en el territorio nacional (Travi et al., 1990; Sierra et al., 2006), que son *Le. columbiana*, *Le. mexicana*, *Le. infantum*, *Le. braziliensis*, *Le. guyanensis*, y *Le. panamensis*, entre las cuales las cuatro últimas están presentes en el Caribe colombiano (Martínez et al., 2010).

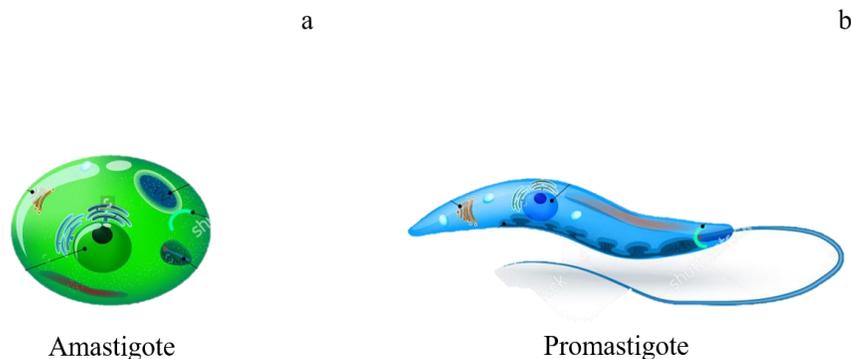


Figura 1. Morfología de los parásitos de *Leishmania* agentes causales de las diversas formas de las leishmaniasis. a). Amastigote, de forma ovalada sin flagelo y localizado dentro de los macrófagos del huésped vertebrado. b). Promastigote, de forma alargada con flagelo que le confiere movimiento y localizado en el tracto digestivo de los insectos vectores. Fuente: <https://www.shutterstock.com/g/Designua>

En los últimos cuatro años (2012 a 2015), según datos del INS se han presentado 36,769 casos de leishmaniasis en el territorio colombiano con un promedio de 9,192 casos/año, de los cuales el 98,2% han sido de LC (incluidos los casos autóctonos urbanos de leishmaniasis de Ovejas, Cartagena, Neiva y El Carmen de Bolívar), 1,6% de LMC y el 0,2% corresponden a LV (Gómez-Romero & Zambrano, 2012; Gómez-Romero, 2013; SIVIGILA/INS, 2014, 2015). Este incremento es atribuible a varios factores, entre ellos el aumento de actividad humana en ambientes silvestres, los desplazamientos de grupos de población, la construcción de obras de infraestructura y el conflicto armado que vive el país. Adicionalmente, algunos factores como el asentamiento de personas en áreas periurbanas, que implica la invasión de áreas boscosas donde habita el vector, podrían favorecer el establecimiento de ciclos de transmisión domésticos urbanos (Desjeux, 2001, 2002; Gore & Nicholls, 2006).

2.2 Los flebotomíneos y su importancia médica

Los flebotomíneos son insectos pequeños y frágiles de actividad nocturna, que normalmente vuelan cerca del suelo, y en condiciones de mucho viento la actividad de vuelo es nula. Aun cuando

existen estudios experimentales de rangos de vuelo de hasta un kilómetro, la mayoría de los flebotomíneos se mantienen a pocos metros de sus sitios de cría o de reposo diurno. Alrededor de 98 especies de flebotomíneos son vectores comprobados o sospechosos de *Leishmania* spp., a humanos, las cuales se encuentran agrupadas en los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* (Figura 2) en el Nuevo Mundo (Killick-Kendrick, 1990, 1999; Maroli et al., 2012). Pero su papel como vectores no solo se limita a las leishmaniasis, los flebotomíneos también participan en la transmisión de bacterias y virus que causan enfermedades al humano y a los animales, entre las que se cuenta la bartonelosis o enfermedad de Carrión, y la fiebre de Sicilia, Nápoles y Toscana, así como la estomatitis vesicular, entre otras (Comer & Tesh, 1991; Basak et al., 2007; Maroli et al., 2012; Tufan et al., 2013).

En el Neotrópico la distribución de la leishmaniasis está limitada por la distribución geográfica de los vectores y los reservorios (Vidyashankar & Noel, 2002; Martín-Sánchez et al., 2004), se estima que 56 especies están incriminadas o son sospechosas de transmitir los parásitos que causan la enfermedad (Killick-Kendrick, 1999; WHO, 2010; Maroli et al., 2012). En Colombia, la riqueza de especies está representada por 163 (Bejarano & Estrada, 2016), y aunque un porcentaje considerable exhiben un comportamiento antropofílico, sólo un pequeño número de éstas han sido halladas infectadas con parásitos del género *Leishmania*, las cuales son *Lu. spinicrassa*, *Lu. columbiana*, *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis*, *Lu. longipalpis*, *Lu. evansi*, *Lu. longiflocosa*, *Lu. trapidoi*, *Lu. yuilli*, *Lu. umbratilis*, y *Lu. hartmanni* (Montoya-Lerma & Ferro, 1999; Ferro et al., 2015). Entre éstas, *Lu. evansi* representa la especie flebotomínea con mayor importancia epidemiológica en el Caribe colombiano, donde ha sido incriminada como el vector principal de *Le. infantum* (Travi et al., 1990), en el foco de LV de los Montes de María y del departamento de Córdoba. A lo anterior se suma que recientemente esta especie ha sido hallada

infectada naturalmente con *Le. braziliensis*, parásitos que causan LC en humanos (Bejarano et al., 2012).



Figura 2. *Lutzomyia* sp., tomando una ingesta sanguínea. Fuente: Wilson, 2014.

2.3 Biología y ciclo de vida de especies del género *Lutzomyia*

El conocimiento actual sobre la biología y el ciclo de vida de las formas inmaduras de las diferentes especies del género *Lutzomyia*, se basa en el resultado de observaciones hechas en laboratorio mediante colonización de diversas especies (Montoya-Lerma & Ferro, 1999), hallazgos casuales en campo y en el uso de trampas de eclosión (Feliciangeli, 2004).

Todas las especies del género *Lutzomyia* son holometábolos con metamorfosis completa e incluye los estadios de Huevo, Larva (incluye cuatro instares), Pupa y Adulto (Figura 3). Los tiempos de duración entre una fase y otra varían de acuerdo con la especie, las condiciones climáticas y al tipo de alimentación disponible (Young & Duncan, 1994; Brazil & Brazil, 2003; Sherlock, 2003). Las hembras necesitan de una ingesta de sangre para completar el desarrollo o maduración de los huevos, por lo general ésta se alimenta en la noche. La necesidad de una segunda

ingesta de sangre en hembras grávidas puede estar relacionado con el mantenimiento del equilibrio hídrico en virtud de la acción de las altas temperaturas y la baja humedad las cuales afectan directamente su capacidad de oviposición (Brazil & Brazil, 2003).

La oviposición es realizada en microambientes estables, ricos en materia orgánica y humedad, con rangos de temperatura variables que les permiten la supervivencia, el crecimiento y desarrollo de las fases inmaduras (Forattini, 1973). Esta selección del sitio de postura de los huevos está guiada por feromonas que actúan como estimulante de agregación y oviposición, lo que indica la acción de ciertos factores físicos y químicos del microhábitat que influyen la oviposición garantizando de esta forma el desarrollo exitoso de los estadios inmaduros (Killick-Kendrick, 1987; Elnaiem & Ward, 1992a, b; Dougherty et al., 1995; Nieves et al., 1997).

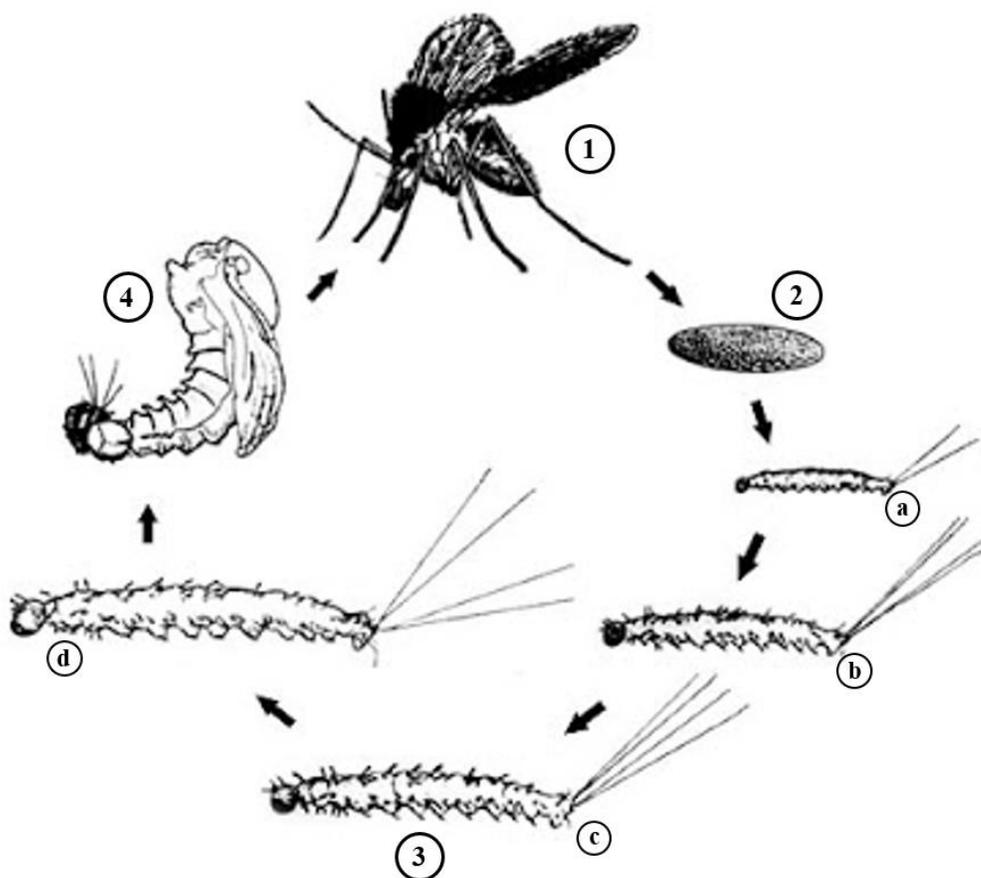


Figura 3. Ciclo de vida de las especies del género *Lutzomyia*. 1) Estadio adulto; 2) Estadio de huevo; 3) Estadio de larva: a-. Instar I, b-. Instar II, c-. Instar III y d-. Instar IV; y 4) Estadio de pupa. Fuente: Adaptado de Walsh, 2011.

2.3.1 Estadios inmaduros.

Por lo general una hembra de *Lutzomyia* puede llegar a ovipositar entre 50 y 100 huevos, la cantidad de éstos es proporcional al volumen de sangre ingerida (Ready, 1979; Lehane, 1991). En condiciones adversas los huevos de algunas especies pueden permanecer en estado de diapausa por cierto tiempo, este mecanismo de resistencia permite la conservación de los huevos ante la presencia de altas temperaturas y en el caso de inundaciones (Forattini, 1973). El desarrollo larval comprende cuatro estadios que se diferencian entre sí en cuanto al tamaño (Barreto, 1941; Johnson & Hertig, 1961; Chaniotis, 1967). El cuerpo está formado por 12 segmentos (Figura 4), tres torácicos (protórax, mesotórax y metatórax), revestidos de finas cerdas implantadas en tubérculos

salientes (Forattini, 1973), y nueve segmentos abdominales, con seudopatas (pseudópodos) de aspecto rómbico que funcionan como órgano locomotor en la parte ventral (Forattini, 1973).

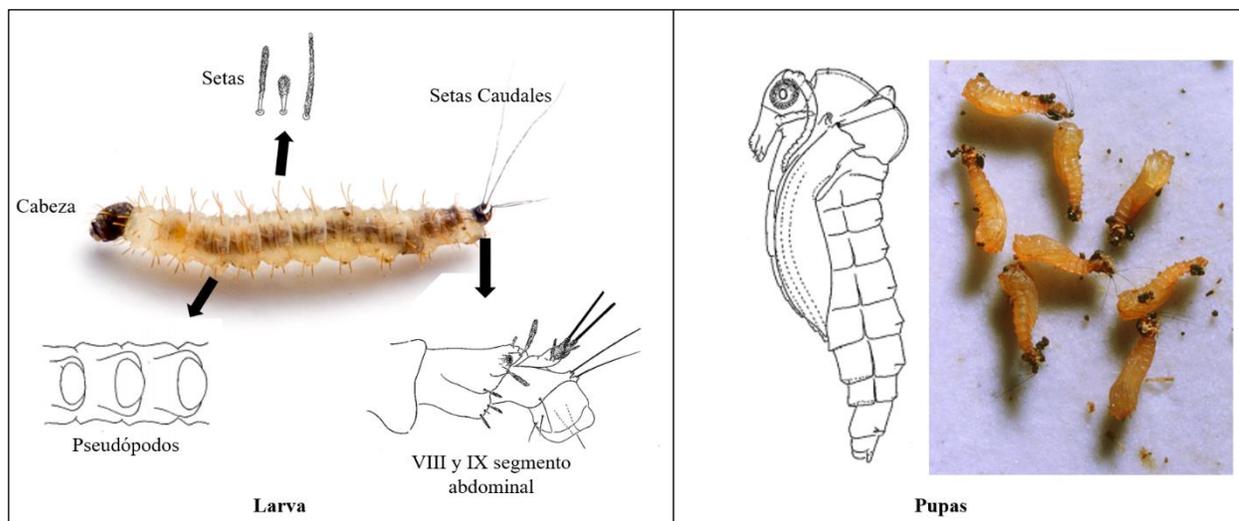


Figura 4. Características morfológicas de larvas y pupas de especies del género *Lutzomyia*. Fuentes: Forattini, 1973; Bertone, 2015; Carrasquilla & Kaufman, 2015.

Las larvas de primer instar tienen una longitud de 0.5 milímetros y presentan un par de setas caudales implantadas en cada tubérculo caudal, no obstante, a partir del segundo instar larval, éstos tubérculos se presentan de manera bífida y por lo tanto, empiezan a mostrar dos setas caudales (interna y externa) en cada lóbulo, así como un incremento en el tamaño del cuerpo hasta alcanzar un tamaño de cuatro milímetros en el último instar larval, donde se puede distinguir una mancha de color negro en el último segmento de la parte dorsal (silla de montar), contiguo a las cuatro setas caudales, lo que lo diferencia del instar anterior (Forattini, 1973; Martínez-Suárez et al., 2012). Antes del paso a pupa, las larvas cesan su alimentación dos o tres días y se fijan al sustrato por la extremidad posterior donde inician el proceso de pupación. Con el paso del tiempo se desarrollan las características morfológicas del insecto adulto, y aproximadamente 40 días después de que la hembra ingiere sangre emerge el insecto adulto (Forattini, 1973).

2.3.2 Estadios Adultos.

Los adultos de *Lutzomyia* presentan un tamaño de aproximadamente cinco milímetros y se les puede reconocer por tener el cuerpo cubierto de finas cerdas que le confieren un aspecto hirsuto, las patas muy largas, y las alas de aspecto lanceolado, distinguibles por la posición que adoptan cuando están en reposo, manteniéndolas en forma de «V». La cabeza es elongada y está articulada a la parte anterior del tórax, se destacan el par de ojos compuestos, la longitud de los palpómeros y flagelómeros. En las hembras la probóscide está especializada para la ingestión de sangre y dispone de partes bucales tipo picador - chupador para tal fin (Travi & Montoya-Lerma, 1994; Cáceres & Villaseca, 2002; El-Hossary, 2006). El tórax es robusto y en éste se insertan un par de alas y halterios y tres pares de patas. Las alas están recubiertas por escamas o microquitias y presentan algunas nervaduras variables en longitud que les sirve para su diferenciación taxonómica. El abdomen está conformado por 10 segmentos esclerosados donde los tres últimos sufren modificaciones para conformar la genitalia (Alvar, 2001; Cáceres & Villaseca, 2002).

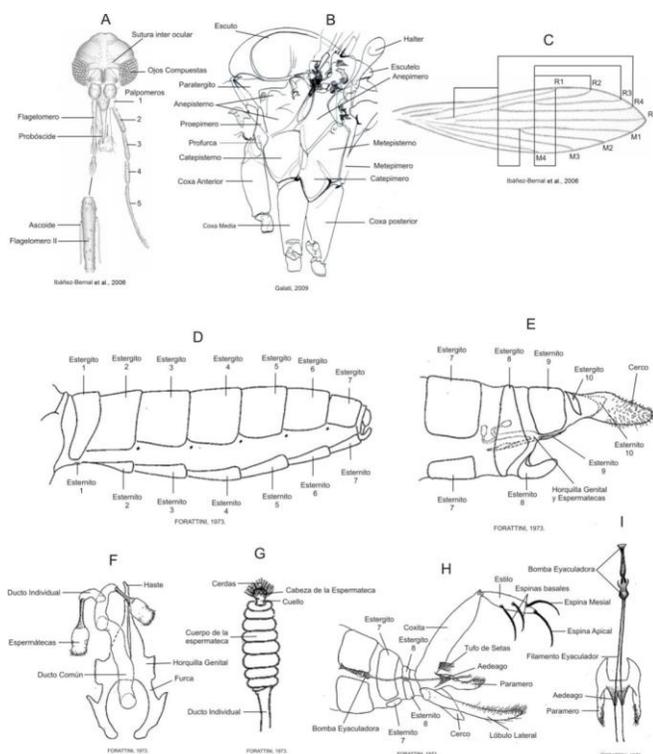


Figura 5. Caracteres morfológicos usados en la identificación taxonómica de los estadios adultos de *Lutzomyia*. A) Cabeza; B) Tórax; C) Ala; D) Abdomen; E) Segmentos abdominales en hembras; F) Horquilla Genital; G) Espermateca; H) Genitalia de Machos; I) Bomba y filamentos genitales. Fuente: Forattini, 1973; Ibañez-Bernal et al., 2006; Galati, 2009.

Los últimos segmentos abdominales en las hembras están constituidos por un par de lóbulos laterales y dos cercos, internamente se encuentra la horquilla genital de la que salen un par de espermatecas con sus conductos individuales. La forma de las espermatecas varía según la especie, confiriéndole importancia taxonómica, mientras que en los machos hay una fuerte armadura genital conformada por un par de coxitas y estilos capaces de sujetar a las hembras durante el apareamiento, estas estructuras presentan setas dispersas o en mechones, así como espinas simples, en número variable. Además de estas estructuras se encuentran también los parámetros, los lóbulos laterales y la bomba genital, todos éstos con importancia taxonómica (Figura 5).

2.4 Sitios de cría naturales de especies del género *Lutzomyia* en el Neotrópico

Aunque se conocen muy bien aspectos en la biología de los flebotomíneos en su estado adulto, especialmente del género *Lutzomyia*, aún persiste un enorme vacío en el conocimiento ecológico de los estadios inmaduros debido a su naturaleza terrestre, la literatura disponible es relativamente poca a cerca de sus sitios de cría naturales. Entre los diversos microhábitats identificados se incluyen base de árboles, madriguera de animales, termiteros, grietas en el suelo, refugios para animales domésticos (ganado, cerdos, gallinas), paredes agrietadas, huecos en los troncos de los árboles, hojarasca, debajo de rocas, raíces tabulares (Felicangeli, et al., 2004).

En el Nuevo Mundo, los reportes de sitios de cría naturales en su mayor parte se centran en investigaciones llevadas a cabo en hábitats selváticos de Brasil, Panamá y Colombia (Hanson, 1961; Alencar et al., 2011; Vivero et al., 2015), y en la medida en que el ciclo epidemiológico de la enfermedad ha cambiado, los esfuerzos por conocer los microhábitats donde se desarrollan los estadios inmaduros de importantes vectores fueron enfocados hacia las áreas rurales y más recientemente hacia las áreas periurbanas y urbanas.

2.4.1 Sitios de cría naturales en ambientes selváticos.

Los primeros registros de recuperación de inmaduros en el Neotrópico se dieron en Brasil con el hallazgo de larvas en la base de un árbol por Ferreira et al. (1938). Posteriormente, Lutz (en Castro 1939) obtuvo algunos flebotomíneos adultos en jaulas de tela que usó para cubrir porciones de suelo en el bosque, y Coutinho y Barretto (1941) hallaron larvas y recuperaron adultos en material obtenido del raspado del suelo, base de árboles y superficie de rocas. Una década más tarde, Forattini (1954) reporta la cría de larvas de *Lu. intermedia* a partir de muestras de suelos tomadas de corrales para cerdos y de matorrales en un área de selva virgen con procesos de intervención agrícola. En los años ochenta, Arias y Freitas (1982) obtienen adultos mediante

trampas de eclosión puestas sobre el suelo del bosque, aunque concluyeron que el suelo del bosque no es uno de los mejores microhábitats para los flebotomíneos.

A pesar de esos hallazgos, las investigaciones se consideraron poco productivas debido a la escasa recuperación de inmaduros en relación con el esfuerzo de colecta, contrastando con la gran abundancia de flebotomíneos adultos encontrados en los lugares de muestreo. Los trabajos realizados en bosques de Panamá por Hanson (1961, 1968) dieron un importante aporte al conocimiento de los inmaduros y de los sitios de cría naturales, con el registro de por lo menos 2,258 inmaduros de flebotomíneos recuperados mediante una técnica de flotación con solución de azúcar y tamizaje, de esos 600 fueron llevados hasta estadio adulto e identificados. Estadios inmaduros de *Lu. trapidoi*, *Lu. dysponeta*, *Lu. sordellii*, *Lu. ovallesi*, *Lu. insolita*, *Lu. serrana*, *Lu. trinidadensis*, *Lu. vespertilionis* y *Lu. gorbitzi* fueron recuperados a partir de muestras de suelo tomadas en árboles con raíces tipo tablares. Entre tanto, inmaduros de *Lu. panamensis*, *Lu. carrerai* y *Lu. ylephiletor* fueron recuperados exclusivamente en la hojarasca del suelo del bosque.

Hasta ese momento, se había demostrado la existencia de microhábitats óptimos para la cría de inmaduros solo a nivel de suelo, pero Thatcher (1968), también en Panamá, demostró la presencia de sitios de cría naturales en árboles, en alturas de seis metros y 12 metros por encima del nivel del suelo, recuperando larvas de las especies *Lu. micropyga* y *Lu. dysponeta*. Pero el microhábitat preferido seguía siendo la base de grandes árboles, sobre todo aquellos con raíces tablares, que actuaban como un gran sistema de protección frente a inundaciones, sirviendo de sitios de cría naturales a especies de *Brumptomyia* y *Lutzomyia* (Rutledge & Mosser, 1972).

A pesar de las consideraciones hechas por Arias y Freitas (1982), el suelo con hojarasca en los bosques servía como un amplio microambiente con todas las condiciones necesarias para el desarrollo de inmaduros en bosques de Panamá, sobre todo en la época de sequía. Es así como

Rutledge y Ellenwood (1975a, b) con trampas de eclosión lograron recolectar adultos de *Lu. trapidoi*, *Lu. panamensis*, *Lu. gomezi*, *Lu. carrerai*, *Lu. rorotaensis* y *Lu. insolita* en este tipo de microhábitats, notando la existencia de interacciones entre algunas especies de plantas y algunas especies de *Lutzomyia*, que determinaban el modelo de producción de éstos en la hojarasca del suelo.

En años más recientes sobresalen los trabajos realizados por Alencar et al. (2011) en una localidad cercana a minas de extracción de metales en la Amazonia brasileña. Mediante diferentes técnicas de recuperación de inmaduros logró obtener 167 individuos, que en su mayoría fueron recuperados en suelos adyacentes a la base de árboles con o sin raíces tablares, mientras que, en suelo del bosque abierto, debajo de trocos caídos y base de palmeras halló muy pocos inmaduros. Por su parte, Vivero et al. (2015) identificó sitios de cría naturales en raíces tablares, en base de árboles, huecos en los troncos de árboles, hojarasca de árboles, corteza de árboles, suelo debajo de troncos caídos y cuevas, logrando recuperar 94 inmaduros de *Lu. migonei*, *Lu. dubitans*, *Lu. serrana*, *Lu. c. cayennensis*, *Lu. micropyga*, *Lu. evansi*, *Lu. gorbitzi*, *Lu. ovallesi*, *Lu. shannoni*, *Lu. trinidadensis*, *Lu. pilosa* y dos especies de *Brumptomyia* (*B. hamata* y *B. mesai*) asociadas a varias especies vegetales (Vivero et al., 2013) en tres reservas naturales de bosque húmedo y bosque seco tropical en Colombia.

2.4.2 Sitios de cría naturales en ambientes rurales.

Debido a la destrucción del hábitat natural donde los flebotomíneos se desarrollan, algunas especies de *Lutzomyia* se han establecido en ambientes domiciliarios, peridomiciliar y extradomiciliar, en cercanías de las viviendas humanas y llegando incluso a ambientes urbanos (Forattini, 1973). Los resultados hallados por Pifano (1941) en Venezuela demuestran lo anteriormente expresado, él encontró cerca de 12 larvas en las grietas de las paredes de una

vivienda, puntualizando que esos microhábitats eran lugares húmedos, ricos en materia orgánica nitrogenada, además de estar protegidos de la luz solar.

La identificación de sitios de cría naturales en ambientes rurales se ha centrado en zonas donde se han presentado brotes de leishmaniasis. En Brasil, Deane (1956) fue el primero en reportar el hallazgo de formas inmaduras del vector *Lu. longipalpis*, posteriormente, Deane y Deane (1957) después de examinar muestras de suelo obtenidas en corrales para burros y debajo de piedras, madrigueras y tronco de árboles halló nuevamente esta especie. Ferro et al. (1997) en un área de transmisión de LV en Colombia, recuperaron adultos emergidos de *Lu. longipalpis*, *Lu. trinidadensis* y *Lu. c. cayennensis*, en una variedad de microhábitats que incluían criaderos de cerdos, corrales de ganado, base de árboles y hojarasca en el peridomicilio de las viviendas y en rocas en el extradomicilio.

Resultados similares fueron obtenidos por Vieira et al. (1999) y Casanova (2001) en áreas rurales con transmisión de LV y LC en Brasil, donde detectaron sitios de cría naturales de *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia* y *Lu. pessoai*, con más frecuencia en hábitats peridomiciliares que en hábitats boscosos. En regiones semiáridas del estado de Bahía con incidencia de LV, y que presenta un tipo de vegetación caracterizado por arbustos dispersos y árboles caducifolios, los sitios de cría naturales, especialmente de *Lu. longipalpis*, fueron hallados en suelos con heces de gallinas, troncos de árboles caídos, interior de viviendas, cavidades rocosas, raíces tablares y grietas en el suelo alrededor de tanques de almacenamiento de agua (Sangiorgi et al., 2012).

2.4.3 Sitios de cría naturales en ambientes periurbanos y urbanos.

Las modificaciones ambientales han generado un aumento en la incidencia y la extensión territorial de las leishmaniasis. La intensificación de los procesos migratorios ha conllevado al rápido y desordenado crecimiento de la periferia de pequeñas y grandes ciudades, lotes baldíos

que sirven como sitios de reposo diurno, la fragmentación de la vegetación cercana al domicilio de las viviendas y la presencia de animales domésticos han creado las condiciones adecuadas para el desarrollo de los vectores lo que ha incrementado la urbanización de la enfermedad en varias ciudades de Latinoamérica (Galati et al., 2015). A pesar de esta perspectiva son muy pocos los estudios de sitios de cría naturales realizados en ambientes periurbanos y urbanos, entre los que se destacan las investigaciones de Parras et al. (2012) en Argentina, Vieira et al. (2012), Casanova et al. (2013) y Souza et al. (2014) en Brasil, y Vivero et al. (2015) en Colombia.

Aunque en los resultados obtenidos por Parras et al. (2012) no fue notorio el número de inmaduros recuperados, aun cuando se inspeccionaron microhábitats en el domicilio, peridomicilio y extradomicilio de las viviendas, si es importante resaltar la presencia de posibles sitios de cría en base de árboles y en refugios para animales domésticos como el perro en la periferia de las viviendas, sobre todo en éste último teniendo en cuenta la presencia de individuos de *Lu. migonei* posible vector de *Le. infantum* (Moya et al., 2015) y porque el perro esta incriminado como el principal reservorio de los parásitos que transmiten la enfermedad (Dantas-Torres, 2007).

Por su parte en Brasil, Vieira et al. (2012), en la búsqueda de sitios de cría de los vectores de LC mediante monitoreo de suelos alrededor de las viviendas y edificaciones en hábitats peridomiciliares, reveló la existencia de sitios apropiados para la oviposición y el desarrollo de inmaduros en el peridomicilio. *Lu. intermedia* (vector de LC) fue la especie con más individuos recolectados en trampas de eclosión. Esos hallazgos refuerzan la hipótesis a cerca de un ciclo de transmisión de la leishmaniasis que incluye al humano y a los animales domésticos, y que la presencia de sitios de cría indica que ese vector puede sobrevivir y transmitir los parásitos de *Leishmania* fuera de las zonas boscosas.

El peridomicilio de las viviendas en los entornos periurbano y urbano usualmente se adornan con arbustos y árboles para sombrío, y la presencia de sitios de refugio para animales domésticos (gallinas y perros) es muy común. Sitios de cría naturales de *Lu. longipalpis* han sido identificados en este tipo de entornos, los refugios para gallinas o gallineros parecen ser los sitios de cría ideales para esta especie según lo hallado por Casanova et al. (2013), porque la materia orgánica como las heces y el alimento de estas aves es degradado completamente y mezclado en el suelo creando hábitats favorables con fuentes de alimentación adecuados para las larvas. Adicionalmente, las gallinas son una fuente de alimentación sanguínea y los refugios pueden servir como sitios de reposo diurno para las hembras adultas. Otros microhábitats identificados se situaron en la hojarasca debajo de los árboles y en escombros al aire libre.

Por su parte, los árboles ornamentales introducidos que son utilizados para sombrío en áreas peridomiciliares, como lo reportado en áreas urbanas de Sincelejo, son microhábitats ideales para la cría de inmaduros entre los que se incluyen *Lu. atrocavata*, *Lu. c. cayennensis*, *Lu. evansi*, *Lu. dubitans*, *Lu. micropyga* y *Lu. rangeliana*. La base, corteza y huecos de los árboles y los montículos de barro creados por hormigas (termiteros) en la base de los árboles proveen condiciones adecuadas de temperatura, humedad relativa, pH del suelo y contenido de materia orgánica para que las hembras de las especies anteriormente mencionadas depositen sus huevos y se dé el desarrollo de inmaduros (Vivero et al., 2015). De los resultados reportados por Souza et al. (2014), se destaca la identificación de sitios de cría naturales de *Lu. intermedia* y *Lu. migonei*, vectores de LC en áreas cercanas a Rio de Janeiro, que proporcionan condiciones favorables para el establecimiento de sitios de cría naturales y el desarrollo exitoso de las formas inmaduras.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar los sitios de cría naturales de los estadios inmaduros de *Lutzomyia evansi* en el área periurbana del municipio de Ovejas, Sucre, Colombia

3.2 Objetivos específicos

Identificar los microhábitats que sirven como sitios de cría naturales de los estados inmaduros de *Lutzomyia evansi* en el área periurbana del municipio de Ovejas

Describir la vegetación asociada a los sitios de cría de los estados inmaduros de *Lutzomyia evansi* en el área periurbana de Ovejas

Determinar las condiciones físicas y químicas del suelo asociado a los sitios de cría de los estados inmaduros de *Lutzomyia evansi* en el área periurbana de Ovejas

4. METODOLOGÍA

4.1 Área de estudio

El municipio de Ovejas (09° 31' 48" de latitud Norte y 75° 14' 01" de longitud Oeste) está ubicado en la subregión Montes de María al norte del departamento de Sucre, a una altura de 265 m.s.n.m., con una humedad relativa y temperatura promedio de 80% y 28°C, respectivamente. La precipitación media anual está entre los 1.000 y 1.380 mm (IGAC, 1996) y es clasificado según Holdridge (1967) como bosque seco tropical (bs-T). La zona urbana y periurbana del municipio presenta un relieve de lomeríos con pendientes altas, erosionadas por la acción humana, sobre todo en los procesos de construcción de viviendas.



Figura 6. Ubicación geográfica del municipio de Ovejas en el departamento de Sucre y de los barrios donde fueron realizados los muestreos.

En términos demográficos, el municipio de Ovejas presenta una población de 21,091 habitantes, de los cuales 11,947 habitantes se ubican en la cabecera municipal (Alcaldía municipal de Ovejas, 2016).

4.2 Criterios de selección de los barrios donde se realizaron los muestreos

Dentro de los municipios que conforman el foco mixto de leishmaniasis de Los Montes de María, Ovejas es uno de los que aporta la mayor parte de los casos de la enfermedad en el departamento de Sucre y en los que se ha registrado el mayor número de casos autóctonos urbanos de LC en la región. Entre los años 2008 a 2012 en la zona urbana del municipio se presentaron 34 casos de leishmaniasis (Epidemiología ETV (Enfermedades Transmitidas por Vectores) Sucre 2012, Datos no publicados). De acuerdo con esos datos epidemiológicos, los barrios Ciudadela Villa Paz, La Pradera, El Oasis, El Tolima, 4 de octubre y San José (Figura 6) fueron escogidos para realizar el estudio. Esos barrios fueron agrupados por área de muestreos y en cada área se seleccionaron 50 viviendas de acuerdo con los siguientes criterios que podían indicar la presencia de sitios de cría naturales: registros históricos de casos de leishmaniasis en el núcleo familiar o en residentes de viviendas aledañas, presencia de flebotomíneos en el peridomicilio y actividad de picadura de estos en el entorno doméstico. También se tuvo en cuenta la presencia de animales domésticos en el patio de las viviendas y la proximidad de las viviendas a fragmentos de bosques, áreas de cultivo o procesos de deforestación.

4.3 Búsqueda de sitios de cría naturales para inmaduros de *Lu. evansi* y recolección de muestras de suelo

La búsqueda de sitios naturales específicos para el desarrollo de estadios inmaduros (huevos, larvas y pupas) de *Lu. evansi* se enfocó hacia todos los microhábitats posibles presentes en los seis barrios, tanto en el intradomicilio, como en el peridomicilio y extradomicilio de las viviendas

seleccionadas. Adicionalmente, se incluyeron los relictos de bosques en proceso de transformación urbana. La selección de los diferentes microhábitats naturales se realizó teniendo en cuenta la literatura científica y la experiencia adquirida en campo en proyectos de investigación enfocados en la búsqueda e identificación de sitio de cría naturales de flebotomíneos en ambientes urbanos.

La recolección de las muestras de suelo fue realizada en la base de árboles, corteza de árboles, huecos en los troncos de los árboles, debajo de árboles caídos, hojarasca, corrales de animales domésticos, incluidas aves de corral, cercas vivas y suelo del interior de algunas viviendas (Figura 7). Las muestras de suelo fueron recolectadas mediante el uso de brochas, palustres y espátulas a una profundidad de 15 cm y un área aproximada de 40 cm². De cada potencial sitio de cría fueron retirados 1000 gramos, aproximadamente, de sustrato. Todo el sustrato recolectado fue depositado en recipientes plásticos (1000 cm³) herméticamente sellados y debidamente rotulados, manteniendo unas condiciones de temperatura y humedad relativa de 27° C y 73% respectivamente, aproximadas a las de los microhábitats muestreados. Las muestras fueron transportadas hasta el Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre, en cajas de poliestireno para evitar la pérdida de las condiciones ambientales.



Figura 7. Microhábitats explorados para la búsqueda de sitios de cría naturales y recolección de suelo. a) Corrales para animales domésticos, b) Base de árboles, c) Árboles caídos, d) Orilla de paredes en bahareque, e) Hojarasca de árboles y f) Desechos al exterior de las viviendas.

4.4 Detección de formas inmaduras de *Lu. evansi*

La búsqueda y el aislamiento de los estadios inmaduros de *Lu. evansi* en los diversos microambientes explorados se realizó de acuerdo con dos metodologías descritas previamente para flebotomíneos (Feliciangeli, 2004; Alencar et al., 2011; Vivero et al., 2015).

4.4.1 Búsqueda directa en estéreomicroscopio de larvas, pupas y exuvias, y cría y mantenimiento de estadios inmaduros.

Un tamizado previo de las muestras de sustrato fue realizado para retirar el exceso de material vegetal (hojas, pedazos de corteza) y piedras, obteniendo así un material más fino y de fácil visualización. Pequeñas cantidades del material fino fueron tomadas y colocadas en una caja de Petri, posteriormente fueron examinados cuidadosamente mediante la ayuda de estiletes haciendo una búsqueda por barrido longitudinal (Figura 8) en un estéreomicroscopio Carl Zeiss™ Stemi™

2000C. La búsqueda de inmaduros implicó un esfuerzo aproximado de 5h/persona para cada una de las muestras procesadas.



Figura 8. Recuperación de estadios inmaduros a partir de muestras de suelo recolectadas en el municipio de Ovejas. a) Búsqueda directa bajo estéreo microscopio y b) Cría y mantenimiento de larvas y pupas recuperadas en condiciones de laboratorio hasta el estadio adulto.

Los inmaduros recuperados vivos fueron puestos individualmente en potes plásticos de cría previamente esterilizados y que contenían una capa de yeso dental No. 2 en la base para mantener la humedad. A cada larva se le proporcionó una alícuota de alimento para larvas del género *Lutzomyia* (proporcionada por el PECET), al igual que pequeñas cantidades de sustrato del sitio de cría donde habían sido recuperadas, mientras que las pupas fueron depositadas en los potes de cría sin alimento y sin sustrato. Las condiciones ambientales de mantenimiento fueron monitoreadas diariamente con un termohigrómetro digital Hygro-Thermometer® RT-811 (precisión $\pm 1^\circ\text{C}$, $\pm 3\%$), manteniendo una temperatura promedio de $28^\circ\text{C} \pm 2$, una humedad relativa de $80\% \pm 5$ y foto periodo de 10:14 (Luz: Oscuridad) (Estrada et al., 2012).

Todos los potes de cría fueron etiquetados con el estadio inmaduro asociado, el lugar geográfico de donde procedía la muestra y el tipo de microhábitat inspeccionado. Las larvas y pupas que murieron durante el proceso de cría en laboratorio fueron retiradas e identificadas hasta el género *Lutzomyia* basados en las características propias de dicho género (Barretto, 1941b;

Hanson, 1968; Forattini, 1973). Posteriormente fueron preservadas de forma individual en tubos eppendorf de 1,5 mL, debidamente etiquetados, a -20°C para ensayos moleculares posteriores. Para el caso de las exuvias recuperadas, éstas fueron conservadas a -20°C para posteriores estudios.

4.4.2 Recuperación de adultos emergidos por medio de incubación de muestras de suelo.

Para evitar la pérdida de huevos o larvas en el primer método, todo el sustrato examinado (1000 gramos) se incubó en potes plásticos (Figura 9) durante 3 meses, a la espera de la potencial emergencia de adultos, teniendo en cuenta el ciclo de vida de la especie (Montoya-Lerma et al., 1998). Se mantuvo una temperatura promedio de 27°C y humedad relativa promedio del 73%, aproximadas a los sitios donde se recolectaron las muestras, condiciones que fueron monitoreadas diariamente con un termohigrómetro Hygro-Thermometer® RT-811, además del fotoperiodo que fue de 10:14 (Luz: Oscuridad). Todos los adultos emergidos fueron retirados por medio de un capturador manual y mantenidos en tubos eppendorf de 1.5 mL individualizados y etiquetados hasta su identificación por taxonomía clásica.



Figura 9. Incubación de muestras de suelo para la recuperación de adultos emergidos de *Lu. evansi*.

Es necesario resaltar que el criterio establecido en esta investigación para incriminar un determinado microhábitat como sitio de cría natural, se basó en la recuperación de por lo menos un estadio inmaduro (larva o pupa) o en la recuperación de un adulto emergido a partir de una muestra de suelo. La emergencia del adulto durante el periodo de incubación se consideró como evidencia indirecta de la presencia de un inmaduro en la muestra de suelo. Por otro lado, las exuvias halladas no fueron contabilizadas como estadios inmaduros, asumiendo que tales exuvias correspondían a mudas de inmaduros ya detectados por búsqueda directa, esto con el fin de evitar sobrestimar la cantidad de inmaduros presentes en cada muestra de suelo.

4.5 Identificación taxonómica de inmaduros del género *Lutzomyia* y flebotomíneos adultos emergidos.

Los adultos emergidos recuperados por incubación de suelo y por cría en laboratorio fueron procesados por maceración química durante 48 h en una solución de ácido láctico y fenol, en

proporción 1:1 (volumen/volumen), con el objetivo de eliminar el exceso de pelos y hacer visibles las estructuras anatómicas internas requeridas para la determinación de especie. Trascurrido este tiempo, se realizaron montajes temporales sobre laminas portaobjetos con una solución de lactofenol. La identificación de especie se realizó de acuerdo con la armadura cibarial y la faringe, así como las espermatecas en las hembras y los genitales externos de los machos (Young & Duncan, 1994) y para la clasificación genérica se adoptó el esquema tradicional de tres géneros americanos integrados por *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya*. Aquellos ejemplares con importancia médica o taxonómica fueron remontados de forma permanente utilizando Bálsamo de Canadá y estarán depositados en la Colección Zoológica de la Universidad de Sucre, en Sincelejo, Colombia.

Los inmaduros que no alcanzaron a completar su desarrollo o que fueron recuperados muertos, se identificaron hasta el nivel de género por presentar las siguientes características morfológicas propias del género *Lutzomyia*. En el caso de las larvas, son eucéfalas con capsula cefálica esclerotizada bien visible, longitud aproximada entre tres y cuatro milímetros, cuerpo vermiforme segmentado en tres partes, que son cabeza, tres segmentos torácicos y nueve segmentos abdominales muy evidentes. Modificaciones en los últimos dos segmentos abdominales muy notorias que dan origen dorso-lateralmente a setas caudales largas, un par de setas para las larvas en instares I y II, y dos pares de setas para larvas en instares III y IV. Presencia de pseudópodos en la parte ventral de los siete primeros segmentos abdominales, subdivisiones de cada segmento abdominal con forma de anillos, y placas tergaes muy evidentes en los últimos segmentos abdominales. Así mismo, presencia de espículas finas y setas a manera de mazos tanto el tórax como el abdomen (Barretto, 1941b; Hanson, 1968; Forattini, 1973).

En las pupas se consideró la forma cilíndrica, conformada por 13 segmentos, los primeros cuatro, unidos dando lugar al cefalotórax, donde se observan la cabeza, el protórax, metatórax y mesotórax, así como varias formaciones, y la presencia de un par de alas en sentido anterior e inferior, de forma larga y triangular, y también la presencia de cerdas desarrolladas en la parte anterior. Abdomen ligeramente en forma de “S”, con presencia de nueve segmentos bien individualizados, en los cuales los dos últimos se encuentran modificados (Barretto, 1941b; Hanson, 1968; Forattini, 1973).

4.6 Descripción de la vegetación asociada a los sitios de cría naturales de *Lu. evansi* en el área periurbana de Ovejas.

Para la descripción de la composición vegetal circundante en cada sitio de cría natural, se contó con la ayuda y asesoría de un especialista en botánica. Se realizó una descripción de las especies de árboles y arbustos mediante el método de parcelas. Cada una de las parcelas ocupó un área de 100m², donde el punto central fue un sitio de cría natural de *Lu. evansi*. En cada área se identificó la familia a la cual perteneció cada especie vegetal asociada a los microhábitats inspeccionados, así como su nombre científico.

4.7 Caracterización ambiental y fisicoquímica de los sitios de cría de las formas inmaduras de *Lu. evansi*

En los criaderos naturales donde se hallaron inmaduros de *Lu. evansi* se realizó una determinación de la temperatura y humedad relativa *in situ* mediante un termohigrómetro digital Hygro-Thermometer® RT-811 (precisión $\pm 1^\circ\text{C}$, $\pm 3\%$). De igual forma se geo-referenciaron todos los lugares inspeccionados mediante un GPS Garmin® GPSMAP® 62sc, para generar un mapa de distribución de microhábitats muestreados.

De cada sitio de cría natural, se retiró una muestra de suelo de 1 kilogramo, hasta una profundidad de 15cm, ésta fue depositada en bolsas herméticamente selladas, rotuladas con el

código del sitio de cría, el tipo de microhábitat, su ubicación en el área de estudio (barrio) y la fecha de obtención de la muestra. Estas muestras fueron transportadas en cajas de poliestireno hasta el laboratorio especializado en suelos de la Universidad de Sucre (Sincelejo) para la realización de los análisis físicos y químicos. A cada muestra de suelo se le determinaron los siguientes parámetros: el pH (Agua 1:1, P/V), Materia Orgánica (%), Fósforo (ppm), Capacidad de intercambio catiónico (C.I.C) (meq./100 gr de suelo), Calcio, Magnesio, Potasio, Sodio y Aluminio intercambiable (Cmol.Kg⁻¹ suelo), Textura del suelo (%), Saturación de Calcio, Magnesio, Sodio y Aluminio (%), Relación Calcio/Magnesio, Conductividad eléctrica (MicroS/cm) y Salinidad (‰). La selección de estos parámetros físicos y químicos se basó en lo reportado en la literatura (Bettini & Melis, 1988; Basimike et al., 1992; Singh et al., 2008; Moncaz et al., 2014; Vivero et al., 2015). Además, varias muestras de suelo, escogidas al azar, de microhábitats donde no se recuperaron inmaduros también fueron recolectadas y sometidas a análisis físicos y químicos. Cada uno de los sitios de cría fue muestreados entre uno y cuatro veces, desde abril de 2013 hasta noviembre de 2015.

4.8 Análisis de los datos

Los datos de campo y los obtenidos en laboratorio fueron registrados en una base de datos con el programa Microsoft® Office Excel 2016, posteriormente éstos fueron procesados para la creación de tablas y gráficos que facilitaran la presentación e interpretación de los resultados. Los mapas de distribución espacial de los sitios de cría naturales y de algunos microhábitats muestreados se realizaron mediante el programa de libre acceso QGIS versión 2.16.0 (Quantum GIS Development Team, 2016), disponible en la página web <http://www.qgis.org/es/site/>.

Para identificar las variables físicas y químicas más sensibles en los suelos de sitios de crías naturales analizados, se realizó un análisis de componentes principales (ACP), lo que permitió

explicar mejor la dispersión de los datos en un gráfico bidimensional (Biplot), a partir de los componentes con mayor varianza. Las variables más sensibles de los componentes, en función de sus valores de contribución, con valores absolutos mayores a 0,10, fueron seleccionadas como indicadores de las propiedades del suelo más explicativas. Posteriormente, para verificar la posible asociación o independencia de estas variables con la cantidad de inmaduros en los sitios de cría, se realizó un análisis de correlación de Spearman entre el número de inmaduros recuperados, como variable dependiente, y el valor de cada uno de los parámetros físicos y químicos evaluados, como variable predictora. Además, un análisis discriminante (AD) fue realizado para mostrar las variables que determinan la presencia de estadios inmaduros en los sitios de cría naturales identificados.

A los datos se les comprobó el supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks, realizada con cada una de las variables cuantitativas. Debido a que los datos no se ajustaron a la distribución normal, se aplicaron las equivalentes pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para determinar las diferencias entre las muestras estudiadas tanto de las variables físicas como las químicas. Un diagrama de cajas se realizó para visualizar la variable o el conjunto de variables más significativas y la dispersión de la(s) misma(s).

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el software R versión 3.3.1 (R Development Core Team, 2016) para Windows y los paquetes *ade4* (Dray et al., 2016), *FactoClass* (Pardo et al., 2015) y *adehabitat* (Calenge, 2015), así como el software estadístico para Microsoft Excel XLSTAT 2016.1 (Addinsoft Company, 2003).

5. RESULTADOS

5.1. Identificación de los sitios de cría naturales de inmaduros de *Lu. evansi* en el área periurbana del municipio de Ovejas

Se inspeccionaron 466 sitios potenciales para la cría de los estados inmaduros de *Lu. evansi* en la zona periurbana del municipio de Ovejas, los cuales fueron categorizados en 13 tipos de microhábitats (Tabla 1). En estos sitios se recolectaron 616 muestras de suelo, destacándose la base de los árboles como los sitios donde se hizo más énfasis en la recolección de muestras, teniendo en cuenta los antecedentes de la literatura. El examen del material recolectado dio como resultado el hallazgo y la recuperación de estadios inmaduros de flebotomíneos en tres tipos de microhábitats: base de árboles, hojarasca de árboles y tronco de árboles caídos.

En los tres tipos de microhábitats identificados como sitios de cría naturales se recuperaron 422 inmaduros, de los cuales 143 (33.9%) inmaduros se consiguieron mediante búsqueda directa en estéromicroscopio, mientras que por la técnica de incubación de suelo en el laboratorio se obtuvieron 279 adultos emergidos (66.1%). Adicionalmente, se encontraron 46 exuvias, que como se justificó en la metodología, no fueron contabilizadas como estadios inmaduros. De los microhábitats muestreados, la base de los árboles fueron los sitios de cría naturales (n=101) donde se encontró la mayor cantidad de estadios inmaduros con el 98,6% del total de individuos recolectados, mientras que en otros potenciales sitios de cría tales como hojarasca de árboles (n=1) y tronco de árboles caídos (n=1) se hallaron tres y un inmaduro, respetivamente.

Tabla 1. *Microhábitats inspeccionados, número de muestras recolectadas y procesadas e inmaduros recuperados en el municipio de Ovejas, durante los años 2013 – 2015*

Microhábitats	No. Microhábitats	Muestras de suelo recolectadas	Kg Muestras recolectadas	Sitios de cría naturales	Búsqueda	Incubación de
					Directa	suelo
					Larvas y Pupas recuperadas	Adultos recuperados
<i>Base de árboles</i>	366	509	510	101	141	275
<i>Hojarasca de árboles</i>	21	22	22	1	1	3
<i>Árboles caídos</i>	16	18	18	1	1	1
<i>Huecos de árboles</i>	14	17	17	-	-	-
<i>Corral para animales</i>	13	13	13	-	-	-
<i>Corteza de árboles</i>	9	9	9	-	-	-
<i>Orilla de cercas vivas</i>	9	9	9	-	-	-
<i>Estructura de casa bahareque</i>	7	7	7	-	-	-
<i>Madrigueras</i>	5	5	7	-	-	-
<i>Basureros</i>	2	3	3	-	-	-
<i>Base de árboles con raíces tabloides</i>	2	2	4	-	-	-
<i>Techo de palma</i>	1	1	1	-	-	-
<i>Troncos de palmeras</i>	1	1	1	-	-	-
<i>Total</i>	466	616	621	103	143	279

De los 143 inmaduros recuperados por examen directo bajo estéreo microscopio, 60 (46 larvas y 14 pupas) completaron su ciclo de vida hasta la fase adulta (Figura 10), lo cual se logró por medio de la cría en laboratorio de los individuos recuperados vivos, manteniendo unas condiciones controladas de temperatura y humedad relativa. Los inmaduros (41.6%) que alcanzaron el estado adulto fueron identificados hasta especie, junto con los 279 adultos emergidos, por medio de los caracteres taxonómicos descritos por Young y Duncan (1994). En cuanto a los restantes 83 inmaduros (75 larvas y 8 pupas), que no alcanzaron a completar su desarrollo o fueron recuperados muertos, se identificaron hasta el nivel de género por la presencia de las características morfológicas propias del género *Lutzomyia*, descritas en la metodología.

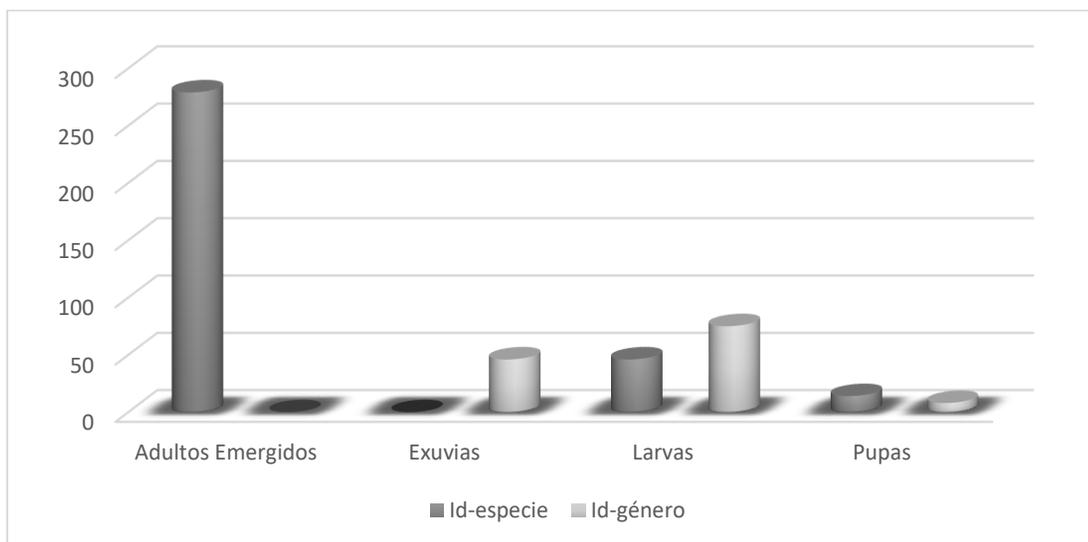


Figura 10. Frecuencia de estadios inmaduros recuperados que completaron su ciclo de vida hasta la fase adulta bajo condiciones de laboratorio.

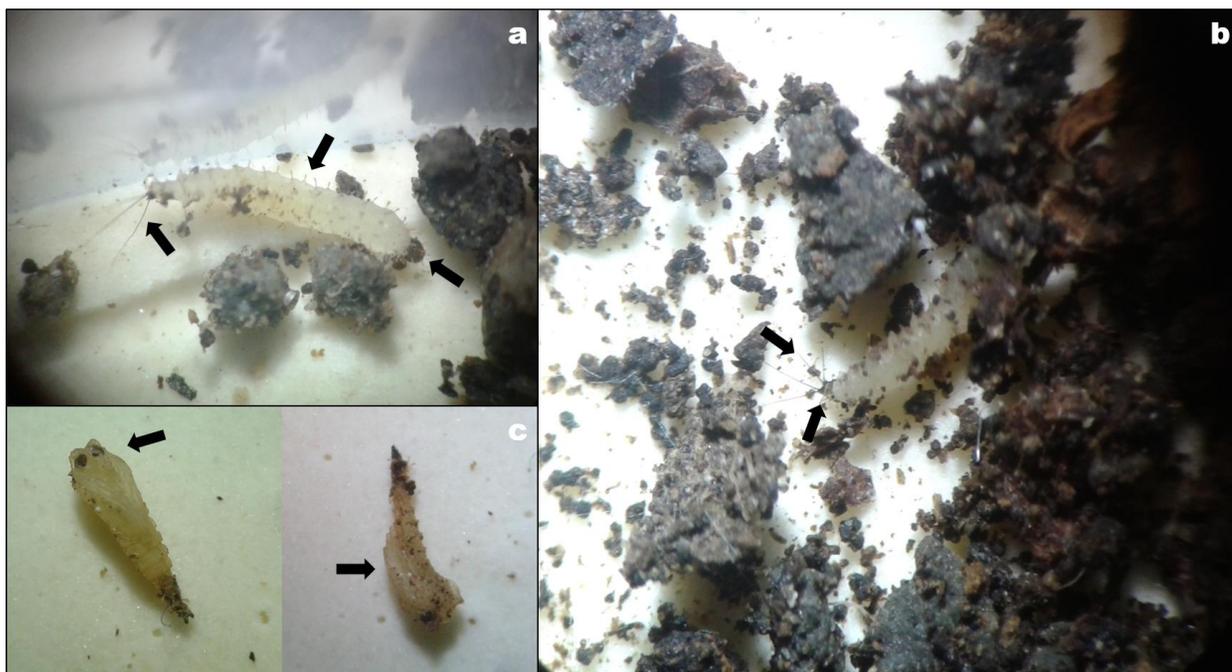


Figura 11. Estadios inmaduros de *Lu. evansi* recuperados en sitios de cría naturales. (a) larva de instar III donde se aprecian (flechas) las setas caudales, la cabeza y las cerdas en forma de mazos en todo el cuerpo. (b) larva de instar IV que denota la presencia de las cuatro setas caudales y la placa tergal esclerotizada. (c) pupas con vista frontal y lateral donde se observan los ojos, el par de alas y los segmentos en forma de anillos del abdomen.

Una vez establecida la identidad taxonómica de los inmaduros recuperados, se determinó que *Lu. evansi* fue la especie con el mayor número de individuos (Figura 11), al alcanzar el 52,6% del total de los inmaduros. Estos fueron recuperados en muestras de suelo obtenidas en 70 sitios de cría naturales, de los cuales 69 correspondieron a base de árboles y uno a hojarasca de árboles. En total, incluidos los individuos recuperados de las especies *Lu. rangeliana*, *Lu. c. cayennensis*, *Lu. atroclavata*, *Lu. micropyga*, *Lu. trinidadensis*, *Lu. dubitans* y *Lu. gomezi*, se identificaron 103 sitios de cría naturales en el área periurbana de Ovejas.

Tabla 2. Frecuencia absoluta y relativa de inmaduros de flebotómíneos recolectados en ambientes periurbanos de Ovejas, Sucre, discriminados por especie.

Especie	Inmaduros identificados	Porcentaje (%)
<i>Lu. gomezi</i> ^a	2	0,5
<i>Lu. dubitans</i>	3	0,7
<i>Lu. trinidadensis</i>	4	0,9
<i>Lu. micropyga</i>	12	2,8
<i>Lu. atroclavata</i>	21	5,0
<i>Lu. c. cayennensis</i> ^a	22	5,2
<i>Lu. rangeliana</i>	53	12,6
<i>Lu. evansi</i>	222	52,6
<i>Lu. sp</i> ^b	83	19,7
Total	422	100

Nota: ^aotras especies vectores de importancia médica en el área. ^bestadios inmaduros identificados hasta género

Definida la identidad taxonómica de los estadios inmaduros, se construyó un mapa del área de estudio con la distribución de sitios de cría naturales de los individuos de *Lu. evansi*, los individuos de las otras especies de *Lutzomyia* recuperadas, así como aquellos microhábitats muestreados donde no se logró recuperar ningún estado inmaduro (Figura 12). En los barrios 4 de octubre, El Tolima y El Oasis se identificaron 30 sitios de cría para *Lu. evansi* y 14 sitios de cría para otras especies de *Lutzomyia*, todos ellos ubicados en el extradomicilio de las viviendas, a una distancia no mayor a 100 metros de éstas. En los barrios La Pradera y ciudadela Villa Paz se identificaron 25 sitios de cría naturales, de los cuales 16 correspondieron a *Lu. evansi* y nueve a otras especies de *Lutzomyia*, todos ellos se ubicaron en el extradomicilio a distancias no mayores a 100 metros de las viviendas. En el barrio San José, 24 sitios de cría naturales fueron identificados para *Lu. evansi* y 10 sitios para las otras especies, de éstos últimos, un sitio de cría fue identificado en el peridomicilio (patio) de una vivienda y los restantes en el extradomicilio, con distancias comprendidas entre los 10 y 100 metros con respecto a las viviendas.

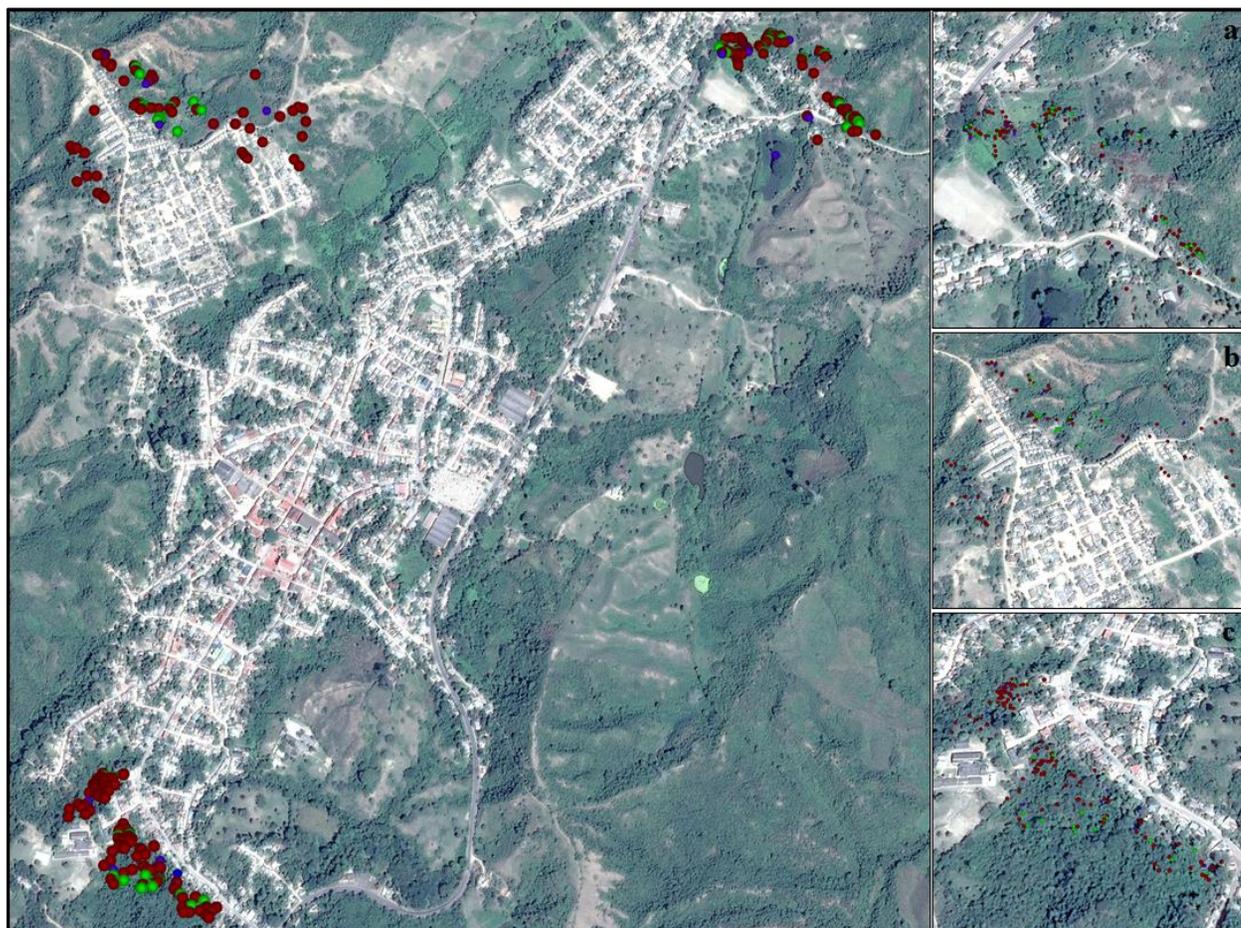


Figura 12. Distribución espacial de los sitios de cría naturales de *Lu. evansi* (puntos verdes) y otras especies de *Lutzomyia* (puntos azules) y de microhábitats donde no se hallaron inmaduros (puntos rojos) en los barrios: a) 4 de octubre, El Tolima y El Oasis, b) La Pradera y ciudadela Villa Paz, y c) barrio San José.

5.2. Descripción de la vegetación asociada a los sitios de cría naturales de *Lu. evansi* en el área periurbana de Ovejas

La descripción vegetal realizada en los barrios donde se hallaron los sitios de cría naturales dio como resultado la identificación de 76 especies vegetales (entre árboles, arbustos y hierbas), agrupadas en 30 familias (Anexo 1).

En aspectos generales, la vegetación presentó una estructura heterogénea con muy pocos individuos arbóreos de gran porte, y con dominancia del estrato arbustivo conformado por individuos de especies arbustivas y árboles jóvenes. De igual forma se presentó un estrato herbáceo constituido por especies herbáceas, enredaderas de bajo porte y plántulas de las especies arbóreas y arbustivas en los barrios 4 de octubre, el Tolima y El Oasis; estas localidades tienen registros históricos de uso agrícola.

La vegetación hallada en el área de muestreo ubicada en el barrio San José, se caracterizó por poseer un número considerable de especies arbóreas que se distribuyeron en el borde de un cuerpo de agua temporal (arroyo), formando un bosque de galería o ripario. Algunos individuos vegetales identificados fueron de gran porte y con dominancia del estrato arbustivo conformado por individuos de especies arbustivas y arbóreas jóvenes. El estrato vegetal constituido por especies herbáceas y plántulas de las especies arbóreas y arbustivas desaparece durante el periodo de bajas precipitaciones, además, el suelo es cubierto por una gran cantidad de hojarasca. Se observó que esta área permanece verde durante los diferentes periodos de precipitación, posiblemente debido a la existencia del arroyo y un nivel freático superficial.

En los barrios La Pradera y ciudadela Villa Paz la vegetación se caracterizó por presentar grupos de plantas formando islas verdes con muy pocos individuos arbóreos de gran porte y con dominancia del estrato arbustivo conformado por individuos de especies arbustivas y arbóreas jóvenes, de igual forma presentó un estrato herbáceo constituido por especies herbáceas, enredaderas de bajo porte y plántulas de las especies arbóreas y arbustiva. Una de las características fue la presencia de especies de enredaderas creciendo sobre árboles y arbustos, pertenecientes a las familias Fabaceae, Apocynaceae y Sapindaceae, que durante el periodo de bajas precipitaciones se hacen más notoria su crecimiento, favoreciendo la conformación de una cobertura verde. Es de resaltar que esta área presenta un alto nivel de intervención antrópica y que durante el periodo de sequía es sometida a quemas.

Los microhábitats identificados como base de árboles (n=366), estuvieron asociados a 31 especies vegetales, distribuidos de la siguiente manera: *Cordia dentata* estuvo representada por 158 individuos (43,2%), seguida de *Guazuma ulmifolia* con 53 individuos (14,5%), árboles no identificados con 49 individuos (13,4%), *Astronium graveolens* con 34 individuos (9,3%), *Ceiba pentandra* con 18 (4,9%) individuos, *Samanea saman* con seis (1,8%) individuos, *Swinglea*

glutinosa con cinco (1,4%) individuos, *Sterculia apetala* y *Hura crepitans* con cuatro (1,1%) individuos.

Las especies vegetales *Acacia farnesiana*, *Machaerium arboreum*, *Gliricidia sepium*, *Azadirachta indica* y *Crescentia cujete* estuvieron representadas cada una con tres (0,8%) individuos, mientras que *Bixa orellana*, *Spondias purpurea*, *Tectona grandis* y *Spondias mombin* estuvieron representadas con dos (0,5%) individuos muestreados y por ultimo las especies *Caesalpinia ebano*, *Albizia* sp., *Cocos nucifera*, *Albizia niopoides*, *Melicoccus bijugatus*, *Mangifera indica*, *Cordia collococca*, *Capparis odoratissima*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Bauhinia forficata*, *Tabebuia rosea* y *Cedrela odorata* cada uno con un (0,3%) individuo muestreado.

De los 366 potenciales sitios de cría naturales correspondientes a base de árboles, se hallaron formas inmaduras en 69 de ellos, distribuidos en 14 especies vegetales. La base de los arbustos de *C. dentata* fue la que aportó el mayor número de sitios naturales (n=63), donde se logró recuperar 268 inmaduros. De estos sitios, 53 correspondieron a sitios de cría de *Lu. evansi* en los que se recolectaron 176 flebotómicos (Tabla 3). En la base del arbusto de *A. graveolens* (n=8) se recuperaron 24 inmaduros, tres sitios naturales de *Lu. evansi* fueron identificados en esta especie vegetal (11 inmaduros identificados). En la base de árboles identificados como árboles sp., (n=7) se recuperaron 29 inmaduros, de los cuales 12 fueron de *Lu. evansi*, que se distribuyeron en cinco sitios de cría. De los siete sitios de cría identificados en la base de los árboles de *G. ulmifolia*, dos de ellos correspondieron a *Lu. evansi* con la recuperación de 12 inmaduros (Figura 13).

Los sitios de cría identificados en los árboles caídos estuvieron asociados a las especies vegetales *C. dentata* (n=7 individuos inspeccionados) y *M. bijugatus* (n=1 individuo inspeccionado), mientras que seis individuos que fueron inspeccionados no se lograron identificar y fueron nombrados como árboles sp., en ninguno de éstos se hallaron inmaduros de *Lu. evansi*, pero si se obtuvieron de otras especies de *Lutzomyia*. Por su parte en la hojarasca, el único sitio de

cría identificado de *Lu. evansi* correspondió a una hojarasca de *A. graveolens* a partir de tres individuos vegetales muestreados. En la hojarasca de las especies *C. dentata* (n=6), *S. saman* (n=3) y árbol sp., (n=8) no se hallaron inmaduros.



Figura 13. Especies vegetales donde se identificaron sitios de cría naturales de *Lu. evansi* en el área periurbana de Ovejas. a) Base de los árboles de *Cordia dentata* (Uvito), b) *Astronium graveolens* (Santa Cruz) y c) *Guazuma ulmifolia* (Guácimo).

Tabla 3. Especies arbóreas y arbustivas donde se hallaron los sitios de cría naturales de *Lu. evansi* y otras especies de *Lutzomyia* en el área periurbana del municipio de Ovejas, Sucre, durante los años 2013 – 2015

Tipo de Microhábitat	Árbol o arbusto (Familia: Especie)	Nombre Común	No. Sitios cría/Total ^c	No. Individuos	Sitios cría Levansi/Total ^d	No. Individuos	Sitios cría Lotras/Total ^d	No. Individuos
Hojarasca	ANACARDIACEAE: <i>Astronium graveolens</i>	Santa Cruz	1/3	4	1/1	4	0/1	0
Árbol Caído	BORAGINACEAE: <i>Cordia dentata</i>	Uvito	1/7	1	0/1	0	1/1	1
	SAPINDACEAE: <i>Melicoccus bijugatus</i>	Mamón	1/1	1	0/1	0	1/1	1
Base de árbol	ANACARDIACEAE: <i>Mangifera indica</i>	Mango	1/1	8	1/1	3	1/1*	5
	ANACARDIACEAE: <i>Astronium graveolens</i>	Santa Cruz	8/34	24	3/8	11	7/8*	13
	ARECACEAE: <i>Cocos nicifera</i>	Coco	1/1	1	0/1	0	1/1	1
	BIGNONIACEAE: <i>Crescentia cujete</i>	Totumo	1/3	1	1/1	1	0/1	0
	BIXACEAE: <i>Bixa Orellana</i>	Achiote	1/2	4	0/1	0	1/1	4
	BORAGINACEAE: <i>Cordia collococca</i>	Muñeco	1/1	3	0/1	0	1/1	3
	BORAGINACEAE: <i>Cordia dentata</i>	Uvito	63/158	268	53/63	176	37/63*	92
	EUPHORBIACEAE: <i>Hura crepitans</i>	Ceiba de leche	3/4	10	0/3	0	3/3	10
	FABACEAE: <i>Samanea saman</i>	Campano	2/6	20	1/2	3	2/2*	17
	MALVACEAE: <i>Guazuma ulmifolia</i>	Guácimo	7/53	32	2/7	6	7/7*	26
	MALVACEAE: <i>Sterculia apetala</i>	Camajón	1/4	1	1/1	1	0/1	0
	MELIACEAE: <i>Cedrela odorata</i>	Cedro	1/1	4	1/1	4	0/1	0
	RUTACEAE: <i>Swinglea glutinosa</i>	Limoncillo	3/5	11	1/3	1	2/3*	10
	SIN NOMBRE: Sin nombre ^a	Árbol sin nombre ^b	7/49	29	5/7	12	7/7*	17
Total			103/333	422	70/103	222	71/103	200

Nota: ^anombre de familia y género no especificado. ^bnombre común no especificado. ^cnúmero de individuos de la especie vegetal muestreados. ^dnúmero de sitios de cría naturales identificados. *sitios de cría naturales compartidos entre individuos de *L. evansi* y de otras especies de *Lutzomyia*.

5.3. Condiciones físicas y químicas del suelo asociado a los sitios de cría naturales de los estados inmaduros de *Lu. evansi* en el área periurbana de Ovejas

Un total de 75 registros fueron utilizados para realizar un análisis estadístico de las variables físicas y químicas de los suelos analizados (Anexo 2), 32 de estos registros provinieron de sitios de cría de *Lu. evansi* (Levansi), siete de microhábitats donde no se recuperaron estadios inmaduros (Lnegativa) y 36 de sitios de cría de otras especies de *Lutzomyia* (Lotras).

Los tres primeros componentes permitieron explicar la dimensionalidad del ACP, con los cuales se explican el 63,36% de la varianza de los datos. Las variables seleccionadas en el componente principal 1 (eje F1) fueron la C.I.C., el Sodio y la textura limo, con una correlación positiva, mientras que la textura arena, presentó una correlación negativa. El segundo componente principal (eje F2) presentó una correlación positiva con la relación Ca/Mg, la saturación de Ca y el pH, y una correlación negativa con la saturación de Mg (Tabla 4). Ambos componentes explicaron el 51,21% de la variación total de los datos (Figura 14).

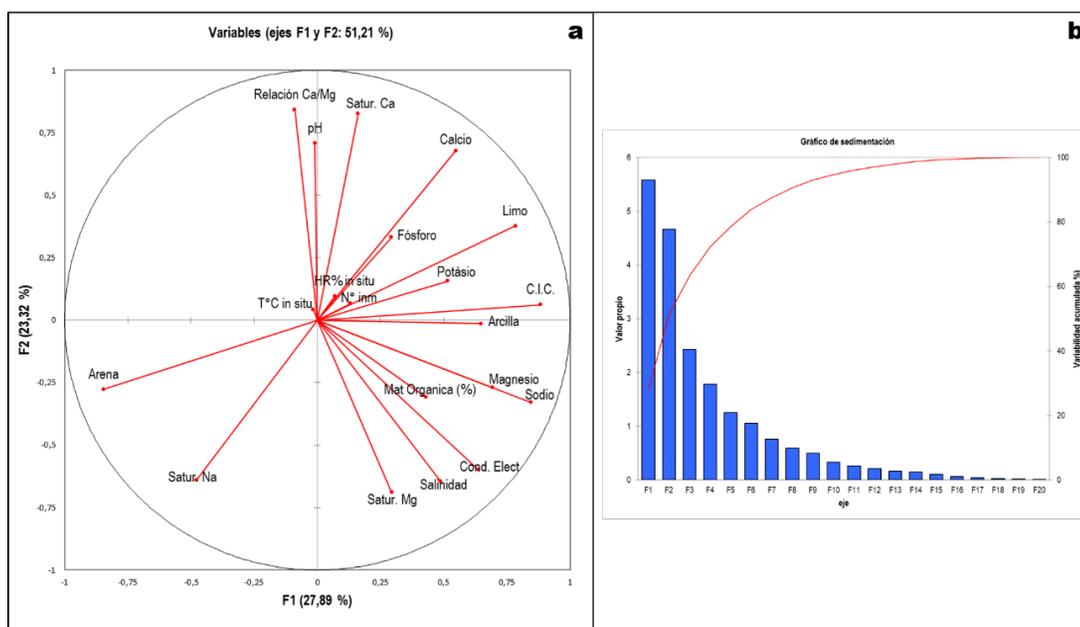


Figura 14. Análisis de componentes principales para las variables físicas y químicas de los suelos de sitios de cría naturales en el área periurbana de Ovejas. (a) relación entre las variables de los sitios de cría naturales de *Lu. evansi*, sitios de otras especies de *Lutzomyia* y microhábitats negativos, (b) gráfica de sedimentación del ACP con valor propicio superior a uno.

Tabla 4. Contribución (%) de cada variable a los componentes principales (ejes de proyección) en el análisis de componentes principales para los suelos analizados en el área periurbana de Ovejas, Sucre durante los años 2013 – 2015

VARIABLES	EJE F1	F2	F3	F4	F5
No. Inmaduros	0,306	0,096	7,062	6,998	9,451
Temperatura °C <i>in situ</i>	0,005	0,038	24,127	4,962	0,642
Humedad Relativa <i>in situ</i>	0,086	0,194	27,159	3,054	7,103
pH	0,002	10,730	3,513	0,057	3,437
Materia Orgánica	3,322	2,035	0,146	20,454	8,655
Fósforo	1,540	2,365	7,522	0,000	24,566
C.I.C.	14,005	0,083	2,263	0,578	0,424
Calcio	5,375	9,862	1,281	5,830	0,000
Magnesio	8,610	1,565	5,465	11,829	3,270
Potasio	4,782	0,533	0,198	19,956	10,805
Sodio	12,826	2,315	0,238	0,023	0,000
Arena	12,792	1,640	1,100	0,916	4,051
Arcilla	7,528	0,004	0,005	2,025	17,314
Limo	11,001	3,042	2,209	0,386	0,036
Saturación de Ca	0,463	14,679	0,002	7,237	1,503
Saturación de Mg	1,553	10,176	3,968	8,575	2,122
Saturación de Na	4,117	8,812	5,755	2,651	0,897
Relación Ca/Mg	0,146	15,214	3,214	0,002	2,944
Cond. Eléctrica	7,293	7,698	3,323	2,221	0,459
Salinidad	4,249	8,920	1,449	2,244	2,322

Aquellas variables físicas del ambiente de los microhábitats, como la temperatura *in situ* y la humedad relativa *in situ*, estuvieron correlacionadas positivamente con el componente principal 3 (eje F3), sin embargo, estas variables explicaron una pequeña proporción del 12,14% de la variabilidad total de los datos.

El análisis de correlación de Spearman permitió conocer que existe una correlación entre las variables Limo (coeficiente de correlación de Spearman = 0,234; $p= 0,044$) y Relación Ca/Mg (coeficiente de correlación de Spearman = 0,227; $p= 0,050$) con respecto a la abundancia de inmaduros en los suelos de los sitios de cría analizados (Figura 15), mientras que para las restantes 17 variables no se halló correlación estadística (Anexo 3).

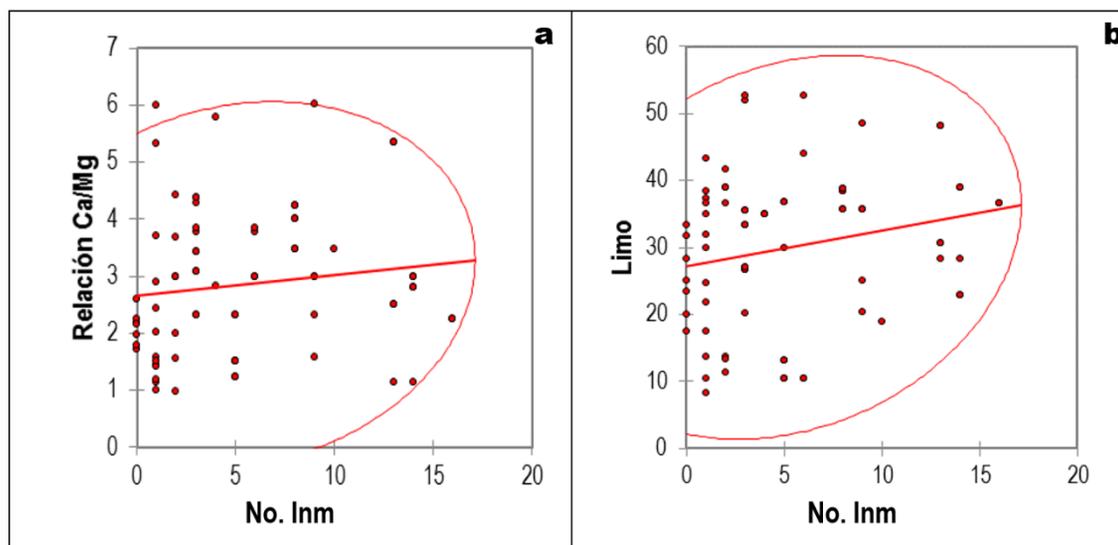


Figura 15. Relación entre las variables de los suelos analizados en los sitios de cría naturales mediante la prueba de Spearman. (a) Relación Ca/Mg con respecto al número de inmaduros. (b) Variable Limo con respecto al número de inmaduros.

En cuanto al análisis discriminante (Anexo 4) permitió establecer que hay un solapamiento de las variables entre los sitios de cría de *Lu. evansi* (puntos verdes) y los sitios de cría de las otras especies de *Lutzomyia* (puntos azules), el cual no permite hacer una diferencia de manera clara entre ellos (Figura 16), sin embargo, si se observó una diferencia con respecto a los microhábitats negativos (puntos rojos).

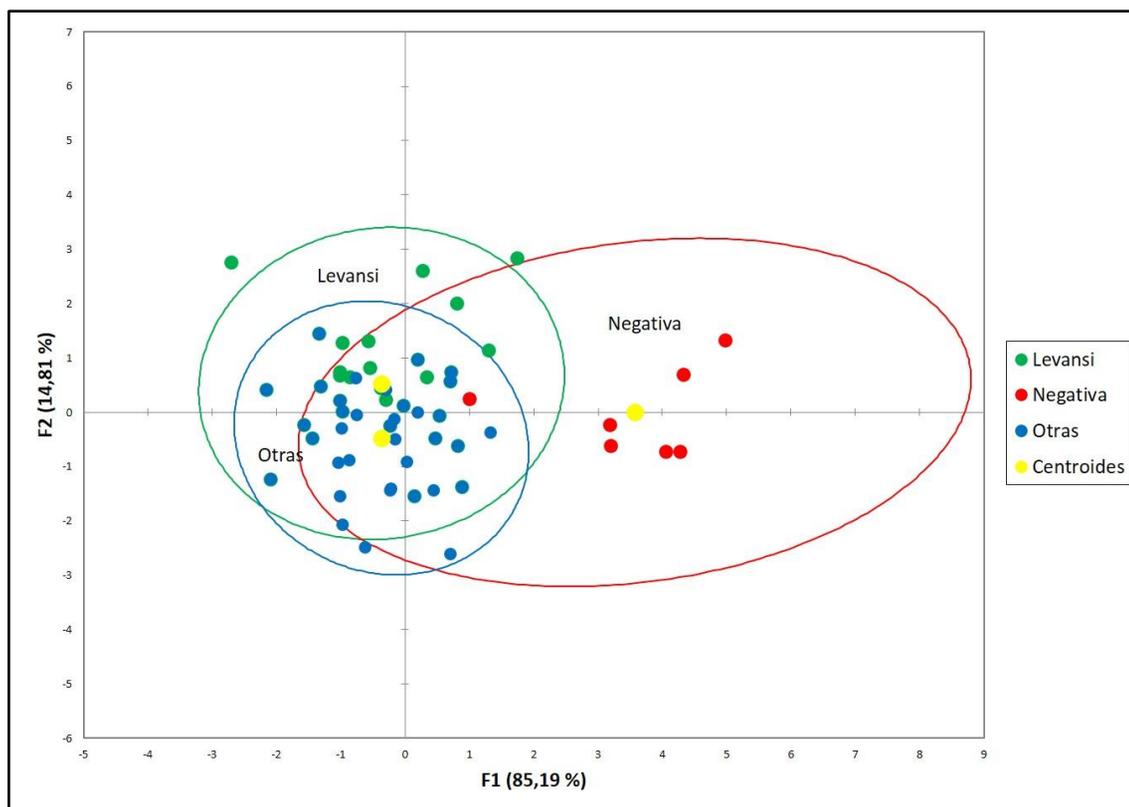


Figura 16. Diagrama de dispersión de los ejes F1 y F2 obtenidos a partir del análisis discriminante para tres grupos de microhábitats naturales (Levansi, Otras y Negativa) con sus centroides, al igual que las elipses de predicción para cada grupo.

De acuerdo a lo observado en el análisis discriminante, la prueba de Kruskal Wallis permitió corroborar la importancia de las variables dentro de las cuales el pH mostró un valor promedio de 7,32 en los sitios de cría naturales donde se hallaron estadios inmaduros de *Lu. evansi* (Anexo 2), mientras que para los sitios de cría de otras especies de *Lutzomyia* se obtuvo un valor promedio de 7,31 y en los microhábitats negativos el pH tuvo un valor promedio de 7,64. Esta variable mostró una diferencia estadística ($p=0,0056$) entre los sitios de cría de *Lu. evansi* y otras especies de *Lutzomyia* en relación a los microhábitats negativos. Por otro parte, la variable Saturación de Mg presentó valores promedios de 24,84% y 21,37% para los sitios de cría de *Lu. evansi* y sitios de cría de otras especies de *Lutzomyia*, respectivamente, en contraste con las muestras negativas que presentaron valores promedios un poco mayores (28,94%). Esta variable presentó una diferencia estadística ($p=0,0155$) entre los sitios de cría de *Lu. evansi* y otras especies de *Lutzomyia* con relación a los microhábitats negativos (Figura 17).

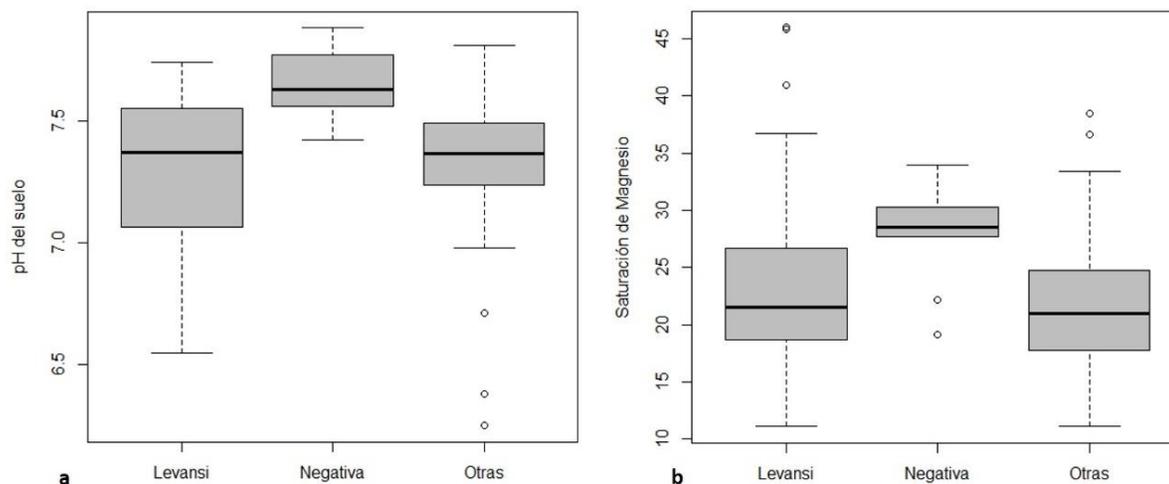


Figura 17. Diagrama de cajas entre los promedios de pH (a) y saturación de Magnesio (b) registrados en los sitios de cría naturales de *Lu. evansi* (Levansi), sitios de cría naturales de otras especies de *Lutzomyia* (Lotras) y los microhábitats negativos (Lnegativa) en el área periurbana de Ovejas, Sucre.

Por último, la tabla de clasificación cruzada presentada a continuación (Tabla 5) mostró que, de los 32 sitios de cría, 21 fueron clasificados como sitios de cría de *Lu. evansi* (Levansi) con una tasa de acierto del 65,63%, mientras que el grupo de microhábitats clasificados como Lotras, 27 fueron bien clasificados con una tasa de acierto del 75% y nueve fueron clasificados dentro del grupo de Levansi. Similar interpretación fue observada en el grupo de microhábitats catalogados como Lnegativa con un porcentaje de acierto del 85,71%, con una tasa de acierto promedio del 72%.

Tabla 5. Clasificación cruzada del análisis discriminante (AD) de los sitios de cría naturales de *L. evansi*, sitios de cría de Lotras y microhábitats Lnegativa en Ovejas, Sucre durante los años 2013 – 2015

de \ a	Levansi	Lnegativa	Lotras	Total	% correcto
Levansi	21	0	11	32	65,63%
Lnegativa	1	6	0	7	85,71%
Lotras	9	0	27	36	75,00%
Total	31	6	38	75	72,00%

Tabla 6. Análisis de Kruskal Wallis realizado a las variables obtenidas en los sitios de cría naturales identificados y microhábitats negativos en Ovejas, Sucre

Variables físicas y químicas	Levansi	Lotras	Lnegativa	Kruskal Wallis Valor H	p-value
Temperatura °C <i>in situ</i>	30,25	30,48	31,11	1,20	0,5481
Humedad Relativa <i>in situ</i>	78,7	78,03	72,14	4,23	0,1201
pH	7,32	7,31	7,64	10,35	0,0056 ^a
Materia Orgánica	3,42	3,65	2,89	0,47	0,7889
Fósforo	139,02	130,08	92,10	4,07	0,1305
C. I. C.	23,43	22,51	24,28	2,27	0,3201
Calcio	17,54	16,08	15,54	0,41	0,8128
Magnesio	6,98	5,55	7,64	5,48	0,0643
Potasio	0,31	0,32	0,21	2,81	0,2444
Sodio	2,18	2,10	2,27	3,02	0,2208
Arena	53,88	57,47	57,00	0,87	0,6466
Arcilla	12,02	12,64	17,39	0,51	0,7722
Limo	32,09	29,05	25,59	3,37	0,1854
Saturación de Ca	60,48	59,40	59,78	0,27	0,8694
Saturación de Mg	24,84	21,37	28,94	8,33	0,0155 ^a
Saturación de Na	8,21	8,63	8,81	0,82	0,6636
Relación Ca/Mg	2,82	3,02	2,09	3,49	0,1739
Cond. Eléctrica	1179,40	935,16	790,28	1,83	0,3989
Salinidad	0,39	0,24	0,31	1,37	0,5032

Nota: ^avalor estadístico significativo ($p \leq 0,05$)

6. DISCUSIÓN

Aunque la búsqueda de sitios de cría naturales de flebotomíneos por lo general parece ser una labor ardua y exhaustiva, por la cantidad de microhábitat que se deben explorar y el número de muestras de suelo por examinar, distintos microhábitats que sirven como sitios de cría han sido descritos en el Nuevo Mundo (Feliciangeli, 2004). Estas descripciones en la mayoría de los casos se relacionan con hábitats selváticos enfocados en lugares con características particulares como, por ejemplo, grandes árboles con raíces tipo tabloides y cortezas fisuradas, huecos en los troncos de los árboles y hojarasca, entre otros, que sirven como microhábitats estables y actúan como sitios tanto de reposo diurno como de cría, mostrando una gran diversidad y número de flebotomíneos. Este tipo de microhábitats han sido estudiados en bosques de Panamá, Brasil y Colombia (Hanson, 1948; Thatcher, 1968; Rutledge & Mosser, 1972; Rutledge & Ellenwood, 1975a; Arias & Freitas, 1982; Christensen & Vasquez, 1983; Cabanillas & Castellón, 1999; Alencar et al., 2011; Vivero et al., 2015).

Sin embargo, dado el cambio en el patrón epidemiológico del ciclo de transmisión de la leishmaniasis en los últimos años, nuevos ambientes ecológicos entran a jugar un papel importante en la adaptación de los vectores y los mamíferos implicados como reservorios de los parásitos. Estas transformaciones han sido evidenciadas en los estudios realizados por Ferro et al. (1997) en El Callejón, un foco rural de LV en Colombia, donde sitios de cría naturales del vector *Lu. longipalpis* fueron detectados en criaderos de cerdos ubicados en el peridomicilio de las viviendas, resaltando la importancia de estos animales domésticos en la alimentación y el mantenimiento de los vectores en el lugar. Los anteriores hallazgos son similares a los reportados por Casanova (2001) en Brasil, que detectó sitios de cría de varias especies de *Lutzomyia* implicadas en la transmisión de LC en hábitats muy cercanos a las viviendas, puntualizando que la cercanía de las

viviendas con el bosque y la presencia de sitios de cría mantienen un ciclo de transmisión secundario diferente al que se da dentro del bosque.

La aparición de casos autóctonos urbanos de la enfermedad en varias ciudades del macrofoco de leishmaniasis de la costa Caribe colombiana (Bejarano et al., 2002; Cortés & Fernández, 2008; Martínez et al., 2010; Zambrano et al., 2016) evidencia la plasticidad adaptativa de *Lu. evansi* a los ambientes fragmentados por las actividades antrópicas en cercanías a las viviendas, donde sus densidades poblacionales alcanzan el 90% de la composición de la fauna flebotomínea presente (Travi et al., 2002; Paternina et al., 2015; Rodríguez et al., 2016). En este contexto, se resalta la importancia de la detección de los sitios de cría naturales de *Lu. evansi* en el área periurbana de Ovejas, por su ubicación a menos de 100 metros de las viviendas, en pequeños parches de bosque fragmentado, algunos destinados a uso agrícola y al mantenimiento de animales domésticos. La presencia de animales domésticos (gallinas, vacas, burros, caballos y cerdos) y silvestres (zarigüeyas) que sirven de fuentes sanguíneas (Paternina et al., 2015), la circulación de tres especies de *Leishmania*, *Le. infantum*, *Le. braziliensis* y *Le. guyanensis* el área (Investigaciones Biomédicas, datos no publicados), sumados a las precarias condiciones de las viviendas, y los hallazgos sobre la identificación y distribución de los sitios de cría naturales cercanos a las viviendas de las localidades estudiadas en Ovejas, podrían conformar los factores que definiría el ciclo periurbano de la enfermedad.

La asociación de sitios de cría naturales de flebotomíneos con especies vegetales ha sido objeto de análisis en varias investigaciones en las que se han recuperado grandes cantidades de inmaduros, esas asociaciones incluyen la base de árboles, raíces tabloides, hojarasca, huecos en los troncos, palmeras y platas epifitas como microhábitats especializados de árboles como *Anacardium excelsum*, *Dinizia excelsa*, *Ceiba pentandra*, *Borassus flabellifer*, *Balanites*

aegyptiaca, *Acacia* spp., entre otras especies vegetales (Hanson, 1961; Rutledge & Ellenwood, 1975b; Asimeng, 1992; Basimike et al., 1992; Alencar et al., 2011; Poché et al., 2012; Moncaz et al., 2014b; Vivero et al., 2015). Los árboles y arbustos donde se realizaron las recolectas de suelo se caracterizaron por conformar un tipo de bosque secundario con una intervención antrópica destinada a establecer áreas de cultivos (barrios 4 de octubre, El Tolima y El Oasis), construcción de viviendas (La Pradera y ciudadela Villa Paz) y de pequeños parches de vegetación en recuperación que en años anteriores fue utilizado como áreas de pastoreo y de cultivos (San José).

La base de los árboles fueron los sitios de cría donde se recuperó la mayor cantidad de los estados inmaduros de este vector, principalmente en el arbusto *C. dentata*, seguido de *A. graveolens*, *G. ulmifolia* y árbol sin nombre y en menor proporción otras especies vegetales presentes en los barrios donde se hizo el estudio. En la ciudad de Sincelejo, sitios de cría naturales urbanos de especies del género *Lutzomyia* fueron asociados a 11 especies vegetales (Vivero et al., 2015), *S. saman*, *M. indica*, *C. kujete*, *C. odorata* y *C. dentata* también estuvieron asociadas a sitios de cría naturales, a pesar de que se hace mención a *C. dentata* pocos inmaduros fueron recuperados en esta especie vegetal, lo que indica que la elección de un microhábitats particular está fuertemente influenciado por las condiciones ambientales locales (Asimeng, 1992).

Durante el trabajo de campo se observaron abundantes plantas herbáceas y malezas que cubrían la base de los árboles donde se identificaron los sitios de cría naturales impidiendo en algunas ocasiones la entrada de los rayos del sol y protegiéndolos del viento y las precipitaciones, sobre todo en la época de lluvias, la presencia de hojarasca en el suelo se hacía notoria para la época de sequía las cuales formaban un “colchón” alrededor de la base y, debajo de este, se apreció un suelo con considerable humedad, además de la presencia de flebotomíneos adultos reposando sobre la corteza. Estas características observadas en este tipo de microhábitats se modificaban solo

cuando se realizaban quemas del material vegetal durante el verano y por la acción de corte de la vegetación herbácea por los lugareños. Es muy probable que estas condiciones ecológicas estén incidiendo en la preferencia de las hembras grávidas por poner sus huevos en este tipo de lugares específicos, además de otro tipo de influencias como feromonas de oviposición, estímulos o la atracción por heces de animales que son depositadas por lo general en cercanías a los árboles y arbustos (Schlein et al., 1989; Elnaiem & Ward, 1990, 1991, 1992a; Elnaiem et al., 1991).

Considerando que podría existir algún tipo de relación ecológica entre las especies vegetales y los individuos de *Lu. evansi*, es importante resaltar que por la cantidad de inmaduros recuperados el arbusto *C. dentata* podrían representar una ventaja con respecto a las demás especies vegetales identificadas. A lo anterior se suma que, en observaciones realizadas en laboratorio durante la cría de inmaduros de esta especie, se notó que larvas de *Lu. evansi* usan como fuente de alimento hojas de este arbusto (Ortega, E. 2014, comunicación personal). Además, la especie vegetal es muy abundante en los barrios donde se realizaron los muestreos, creciendo en matorrales, malezas y bosques bajos subxerofíticos intervenidos por el humano. Por su buena producción de biomasa, es usado en cercas vivas como postes y forraje, y al ser podado tiene alta capacidad de rebrotes, inclusive durante la época seca, los frutos sirven de alimento a aves, reptiles, insectos y pequeños mamíferos (Cordero et al., 2003; Barajas et al., 2005), creando las condiciones necesarias para estos insectos; fuente de alimento, sitios de reposo y protección ecológica. No obstante, se requiere comprobar si otras especies vegetales, como *A. graveolens* y *G. ulmofolia*, que mostraron condiciones ecológicas similares y también sirvieron como sitios de cría de *Lu. evansi*, sirven como fuente alimenticia para estados inmaduros.

Aunque en la hojarasca y en los árboles caído/podridos se hallaron inmaduros, fue muy bajo el número de sitios de cría identificados en este tipo de microhábitats, lo que hace suponer

que diversos factores como el tipo de estructura florística (naturaleza y posición en el bosque), la topografía del suelo y la morfología de los árboles, podrían influir en las condiciones microclimáticas que determinarían la frecuencia y distribución de las poblaciones de flebotomíneos, favoreciendo el establecimiento de sitios de cría naturales (Scorza y Ortiz, 1960; Rutledge et al., 1976; Le Pont y Pajot, 1980; Geoffroy et al., 1986).

La oviposición en los flebotomíneos está controlada a través de una combinación de interacciones complejas entre factores ambientales, físicos y químicos. Uno de los aspectos indispensables en el estudio de sitios de cría naturales es la determinación de las características que presenta el suelo de un determinado sitio de cría que permiten el desarrollo y la supervivencia de los inmaduros. Conocer la naturaleza física y química de los sustratos en los sitios cría es la base para el conocimiento de la ecología de estadios inmaduros de los flebotomíneos (Killick-Kendrick, 1987; Dougherty et al., 1995; Nieves et al., 1997).

Respecto a los factores físicos se ha mostrado que la temperatura y humedad relativa son importantes porque regulan el comportamiento de oviposición y desarrollo larval (Foster et al., 1970; Chaniotis, 1986), valores óptimos de estos factores permiten el normal desarrollo de los inmaduros, un aumento leve de estas ocasiona un descenso en los tiempos de duración del desarrollo larval, mientras que un extremado aumento incrementa las tasas de mortalidad de los mismos. En cambio, un descenso retarda el desarrollo del ciclo de vida huevo-adulto de estos insectos (Theodor, 1936; Barretto, 1941a; Chaniotis, 1967; Endris et al., 1987).

Los valores de temperatura y humedad relativa *in situ* hallados en los microhábitats identificados (Levansi, Lotras y Lnegativa) fueron similares a los reportados en microhábitats de flebotomíneos identificados en área tropicales (Vivero et al. 2015). No se encontró una diferencia estadística entre la temperatura y humedad relativa *in situ* y los microhábitats, estos factores

aportaron un porcentaje (14,14%) a la variabilidad de los datos en el ACP. Es probable que la vegetación presente en las áreas de estudio pueda estar favoreciendo las condiciones de temperatura y humedad relativa en los sitios de cría naturales, por el efecto sombrío y la ausencia de corrientes de aire, aunque, estas pueden diferir a las del macroentorno (Rutledge & Ellenwood, 1975b; Parras et al., 2012). Alencar et al. (2003) no encontró una correlación entre el número de inmaduros recuperados y la temperatura registrada en sitios de cría de la base de árboles, no obstante, otros estudios evidencian una relación de la temperatura y humedad relativa como un factor de oviposición y de eclosión de pupas que permanecen en estado de latencia (Chaniotis et al., 1972).

El establecimiento de un microhábitat como sitio de cría está influenciado por la especie de flebotomíneo y por el tipo de suelo, lo cual incide en la abundancia y distribución de estos insectos (Minter, 1919; Basimike et al., 1992). La textura de los suelos es una de las variables que determinan la presencia de inmaduros, estadios larvales han sido recuperados de varios tipos de suelos en los que se incluyen arenosos, francos, limosos y arcillosos (Bettini & Melis, 1988; Basimike et al., 1992; Moncaz et al., 2014a, 2014b; Kesari et al., 2014; Vivero et al., 2015), evidenciando la adaptabilidad de algunas especies de flebotomíneos a una variedad microhábitats.

Los suelos analizados en Ovejas presentaron una textura limosa y una correlación ($p=0,004$) con la cantidad de inmaduros recuperados, propicios para el desarrollo de las larvas y pupas, y que estas lleven a cabo de sus funciones metabólicas. Este tipo de suelos se caracterizan por presentar materia orgánica que se descompone muy rápidamente, dándole una enorme proporción de nutrientes, además presentan una mezcla entre arena y arcilla lo que les permite tener una mediana capacidad de retención de agua y mantenerse húmedos (Brady, 1990). En contraste, los tipos de suelos arenosos que tienen muy poca capacidad de retención de agua y

nutrientes esenciales necesarios para la alimentación de los inmaduros, y los suelos arcillosos que por su porosidad tienden a retener muchas cantidades de agua, provocando la muerte de las larvas por inmersión, no mostraron correlación con respecto a la cantidad de inmaduros.

El pH es quizás el factor que más se ha estudiado en los sitios de cría naturales de flebotomíneos (Rutledge & Mosser, 1972; Bettini & Melis, 1988; Basimike et al., 1992; Singh et al., 2008; Alencar et al., 2011; Moncaz et al., 2014a y b; Kesari et al., 2014; Vivero et al., 2015), y uno de los factores abióticos indispensable para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos y disponibilidad de nutrientes en el suelo. Los microhábitats donde se hallaron formas inmaduras presentaron valores promedios de pH de 7,4 (Anexo 2), mientras que en los microhábitats negativos este fue ligeramente más elevado (pH promedio de 7,6), representando una diferencia que posiblemente se vea reflejada en la presencia de inmaduros ($p=0,0056$) en los microhábitats identificados. Estos valores están en concordancia a los reportados Vivero et al. (2015) en microhábitats naturales con pH alcalinos (7,4 – 8,3) en áreas urbanas donde se recuperaron tres inmaduros de *Lu. evansi*.

Los inmaduros pueden sobrevivir en suelos con rangos de pH que van desde los 4,3 (suelos ácidos) hallados en base de árboles (Alencar et al., 2011) hasta suelos con pH de 9,1 (suelos básicos) hallados en el perímetro de establos para ganado (Singh et al., 2008), sin embargo, en los suelos con pH con tendencia a valores neutros a levemente alcalinos pueden ser esenciales para los procesos de homeostasis debido a que las larvas absorben la humedad por los tegumentos y propician el crecimiento de microorganismos que pueden servir como fuente de alimentación a las larvas (Adler & Theodor, 1957; Bettini & Mirles, 1988).

Las características geológicas de los suelos de los Montes de María indican que son producto de formaciones calizas provenientes del Mioceno, la presencia de Carbonato de Calcio

(CaCO₃) en su mayor parte y de Magnesita (MgCO₃), en menor proporción (IDEAM, 2005), pueden influir directamente en el complejo absorbente de intercambio catiónico que regula el pH en estos suelos. La presencia de vegetación contribuye a la edafología del suelo, el crecimiento de las raíces es importante para la meteorización del suelo y la expulsión de CO₂ por parte de éstas, y la presencia de agua, aceleran el proceso de degradación de calizas (carbonatación), los iones liberados son entonces absorbidos desde los estratos inferiores del suelo para mantener la fertilidad de los mismos.

Los cationes absorbidos por el complejo de intercambio catiónico pueden ser desplazados por otros según sea la fuerza de absorción del ion, su predominancia y concentración, la presencia de otros cationes y la selectividad de los mismos. Los cationes intercambiables en el coloide del suelo siguen un orden por regla general: Al⁺³ > H⁺ > Ca⁺² > Mg⁺² > K⁺ > Na⁺ (Bohn et al., 2001; Essington, 2003; Sparks, 2003). Los cationes Calcio (Ca⁺²), Magnesio (Mg⁺²) y Sodio (Na⁺) fueron los que más predominaron, mientras que el catión Potasio (K⁺) se halló en menor concentración, siguiendo el orden Ca⁺² > Mg⁺² > Na⁺ > K⁺. La presencia de suelos con pH de 7,4 en microhábitats donde se hallaron inmaduros de *Lu. evansi* y de otras especies de *Lutzomyia* y pH de 7,6 en microhábitats negativos se relacionan con las concentraciones Ca⁺² el cual reemplaza los cationes Al⁺ y H⁺ debido a la naturaleza de los suelos de esta área asociados a las cantidades de CaCO₃ (Bettini y Mirles, 1988).

Las concentraciones de Mg⁺² tienen relación con las concentraciones de Ca⁺², al aumentar la concentración de uno la del otro tiende a disminuir, además la saturación de Mg⁺² tiende a bajar los valores de pH en los suelos, que sumado a una saturación del Ca⁺² puede producir una floculación de los colides del suelo y por lo tanto un efecto positivo sobre la agregación del suelo. El Na⁺ a pesar de tener una correlación positiva en el primer eje del ACP, su concentración

en los microhábitats no parecer ser una variable de alto impacto, y eso se puede reflejar en los valores de Salinidad que no presentaron variación entre microhábitats.

La capacidad de intercambio catiónico (C.I.C) determina la capacidad que tiene un suelo en la retención de los cationes, ejerciendo influencia directa en la dinámica de los cationes en el suelo (Zech et al., 1997). La C.I.C. en los microhábitats no mostró variación entre sí, pero si muestra la capacidad que tienen para retener una mayor cantidad de nutrientes sin sufrir pérdidas por los procesos de lixiviación, prolongando una fertilidad a través del tiempo. Aunque el tipo de suelo predominante fue el limoso, se observó una correlación entre la arcilla y la materia orgánica en los microhábitats (análisis de Spearman), lo que permitiría deducir por qué la relevancia de esta variable en los suelos analizados.

En los microhábitats negativos los valores de relación de Ca/Mg fueron inferiores a los registrados en los sitios de cría de *Lu. evansi* y de otras especies ($p=0,050$), lo que indica que para que un sitio determinado se encuentren estadios inmaduros, es necesario que los niveles esta variable estén cercanos o sobre tres (Anexo 2). La saturación de Magnesio mostró una correlación negativa en el ACP, y una diferencia estadística significativa en el análisis de Kruskal Wallis ($p=0,0155$), y valores por debajo de los registrados en los microhábitats donde no se hallaron formas inmaduras. Es sabido que niveles de saturación de Mg altos inciden en los valores de pH y que una modificación en esta variable puede afectar la supervivencia de los inmaduros hallados en los sitios de cría identificados en el municipio de Ovejas, además, en estos sitios los valores de pH estuvieron por encima de los registrados en los sitios de *Lu. evansi* y de otras especies.

En síntesis, los microhábitats en los que se recuperaron inmaduros de *Lu. evansi* y de otras especies de *Lutzomyia*, mostraron unas marcadas diferencias con los microhábitats negativos, de lo cual se deriva que valores de pH de 7,4 (promedios), la textura del suelo (limosos) que

determina la CIC y por consiguiente la retención de cationes como el Ca^{+2} , un balance óptimo de la relación Ca/Mg por encima de 3, son factores necesarios para que los inmaduros puedan desarrollarse en el área periurbana del municipio de Ovejas, Sucre. Es posible suponer entonces que la presencia y distribución de estadios inmaduros en un microhábitat no solo depende del pH hallado y el tipo de textura del suelo, sino que también depende de la concentración de los cationes presentes que determinan la disponibilidad de nutrientes, en la que se ha demostrado cierta correlación con algunas especies flebotomíneas (Basimike et al, 1992; Polseela et al., 2011; Kesari et al., 2014).

Por otro lado, a pesar del limitado número de inmaduros encontrados de otras especies de flebotomíneas, es importante resaltar en la presente investigación el hallazgo de sitios de cría de *Lu. gomezi*, una especie altamente antropofílica implicada en la transmisión de *Le. braziliensis* en Colombia (Travi et al., 1988), así como la detección de sitios de cría de *Lu. c. cayennensis*, que ha sido hallada infectada naturalmente con parásitos tripanosomatídeos en este municipio (Cocheo et al., 2007). Por otro lado, no se observaron sitios de cría de *Lu. panamensis* a pesar de ser la segunda especie flebotomínea más abundante en el área de estudio y que ha sido hallada infectada con parásitos de *Le. infantum*, *Le. braziliensis* y *Le. guyanensis* (Investigaciones Biomédicas 2106, Datos no publicados), por lo cual los estudios futuros deberían enfocarse en la caracterización de los sitios de cría de estas especies. Sin embargo, una vez se identifiquen los sitios de cría de los principales vectores de *Leishmania* en la zona, el principal reto de los investigadores es usar esta información para desarrollar nuevos métodos de control vectorial de la leishmaniasis.

7. CONCLUSIONES

Se registra por vez primera la presencia de sitios de cría naturales para el desarrollo del ciclo de vida del vector *Lutzomyia evansi*, como se deriva en la detección de 70 sitios naturales de cría ubicados a menos de 100 metros de las viviendas, lo que evidencia la adaptación de tiene esta especie.

Sitios de cría naturales de otras especies de importancia medica como *Lu. gomezi* fueron identificados en las proximidades a las viviendas en el municipio de Ovejas.

La mayoría de los sitios de cría de *Lu. evansi* se encontraron asociados a la base de los árboles, especialmente *Cordia dentata*, que parece ofrece las condiciones necesarias para el establecimiento de sitios de cría naturales en las proximidades de las viviendas.

Los microhábitats con presencia de inmaduros de *Lu. evansi* y de otras especies, presentan diferencias con respecto a los microhábitats donde no hubo presencia de inmaduros, en cuanto a las propiedades físicas y químicas de los suelos, además la abundancia de inmaduros recuperados mostró una relación con algunas condiciones físicas y químicas del suelo como textura (limoso) y la relación Calcio-Magnesio, lo cual determinó la presencia y distribución de las formas inmaduras recuperadas, especialmente de *Lu. evansi* el vector más abundante en toda la zona periurbana del municipio.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda ampliar el estudio a otro tipo de microhábitats presentes en el área periurbana del municipio, así como enfocar los esfuerzos de muestreos en hábitats peridomiciliares e inclusive intradomiciliares donde también se podría estar desarrollando *Lu. evansi*.

Se recomienda indagar a cerca de los posibles sitios de cría naturales de otras especies flebotomíneas presentes en Ovejas, particularmente de *Lu. panamensis* teniendo en cuenta la presencia de densidades considerables de adultos en el área periurbana del municipio y que es la segunda especie de mayor importancia médica en la zona.

Se recomienda realizar estudios para estimar la productividad de inmaduros en los distintos microhábitats durante la época seca y la época de lluvias.

Se recomienda determinar cómo influyen las fluctuaciones climáticas en los parámetros fisicoquímicos del suelo donde se están desarrollando los inmaduros de *Lu. evansi*.

Se recomienda estudiar el posible papel que están jugando las especies vegetales *Cordia dentata* (Uvito), *Astronium graveolens* (Santa Cruz) y *Guazuma ulmifolia* (Guácimo) en el establecimiento de sitios de cría naturales de *Lu. evansi*.

Considerando las diferencias detectadas en cuanto a las propiedades físicas y químicas entre los microhábitats con presencia y ausencia de inmaduros, se recomienda diseñar medidas de control sobre los sitios de cría naturales que modifiquen las variables que favorecen el desarrollo de las formas inmaduras.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addinsoft Company (2003). XLSTAT, Perform Data Analysis and Statistics Calculations. Version 2016.1. (Software PC). New York. <https://www.xlstat.com/es/descargar>
- Adler, S. & Theodor, O. (1957). Transmission of disease agents by phlebotomine sand flies. *Annual Review of Entomology*, 2: 203–226.
- Alcaldía municipal de Ovejas (2016). Plan de Desarrollo Municipal 2015 – 2019. Municipio de Ovejas. Autores. Recuperado el 20 de septiembre de 2016, de <http://www.ovejas-sucre.gov.co/apc-aa-files/30626236343938333261396337346635/plan-desarrollo-de-ovejas.pdf>
- Alencar, R. B., Queiroz, R. G. & Barrett, T. V. (2011). Breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and efficiency of extraction techniques for immature stages in terra-firme forest in Amazonas State, Brazil. *Acta Tropica*, 118: 204–208.
- Alvar, J. P. (2001). *Las Leishmaniasis: de la biología al control* (2a. ed.). Salamanca, España: Laboratorios Intervet, S. A.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J. et al. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of Its incidence. *PLoS One*, 7(5): e35671.
- Arias, J. R. & Freitas, R. A. (1982). On the vectors of cutaneous leishmaniasis in the Central Amazon of Brazil. 4. Sand fly emergence from a ‘terra firme’ forest floor. *Acta Amazonica*, 12: 609–611.
- Asimeng, E. J. (1992). Natural habitats of Phlebotomine sandflies in Northern Nigeria. *Insect Science and its Application*, 13(1): 113–119.
- Barajas, F., Galidon, R. & Fernández, J. L. (2005). *La familia Boraginaceae en el departamento de Santander – Colombia. Tratamiento taxonómico sinóptico*. Tesis para optar al título de Biología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Barretto, M. P. (1941a). Observações sobre a biologia do *Phlebotomus whitmani* Antunes e Cautinho, 1939 (Diptera, Psychodidae) em condições experimentais. *Papeis Departamento da Zoologia*, 13: 87–100.

- Barretto, M. P. (1941b). Morfologia dos ovos, larvas e pupas de alguns flebótomos de São Paulo. *Annais da Faculdade do Medicina da Universidade do São Paulo*, 117(2): 356–427.
- Basak, S., Mondal, A., Polley, S., Mukhopadhyay, S. & Chattopadhyay, D. (2007). Reviewing Chandipura: a vesiculovirus in human epidemics. *Bioscience Reports*, 27: 275–298.
- Basimike, M., Mutinga, M. J., Kumar, R. & Munyinyi, D. (1992). Relative abundance of adult phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in relation to soil characteristics of their breeding sites in Baringo district, Kenya. *Environmental Entomology*, 21(5): 1114–1120.
- Bejarano, E. E., Uribe, S., Rojas, W. & Vélez, I. D. (2002). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(5): 645–647.
- Bejarano, E. E., Pérez-Doria, A., Paternina, L. E., Paternina-Gómez, M. & Martínez, L. (2012). Natural infection of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania (Viannia)* spp., in northern Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(1):173.
- Bejarano, E. E. & Estrada, L. G. (2016). Family Psychodidae. Wolff, M., Nihei, S., Carvalho, C. (Eds). *Catalogue of Diptera of Colombia* (pp 187 – 238). Auckland: Magnolia Press.
- Bertone, M. (2015). Sand fly larvae (Psychodidae). Recuperado el 3 de octubre de 2016, de <https://www.flickr.com/photos/76790273@N07/19214341631>
- Bettini, S. & Melis, P. (1988). Leishmaniasis in Sardinia. III. Soil analysis of a breeding sites of three species of sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 2: 67–71.
- Bohn, H. L., McNeal, B. L. & O'Connor, G. A. (2001). *Soil chemistry* (3a. ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Bonfante-Garrido, R., Barroeta, S., Mejía de Alejos, M.A., Melendez, E., Arredondo, C., Urdaneta, R. & Urdaneta, I. (1984). Leishmaniasis cutánea urbana en Barquisimeto, Venezuela. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 97: 105–110.
- Brady, N. C. (1990). *The natural and properties of Soils*. New York: Macmillan Publishing Company.

- Brazil, R. P. & Brazil, B. G. (2003). Biología de flebotómíneos neotropicales. Rangel, E. F. & R. Lainson, R (Eds.). *Flebotómíneos do Brasil* (pp 257 – 274). Rio do Janeiro: Editora Fiocruz.
- Cabanillas, M. R.S. & Castellón, E. G. (1999). Distribution of sandflies (Diptera: Psychodidae) on tree-trunks in a non-flooded area of the Ducke Forest Reserve, Manaus, AM, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94: 289–296.
- Cáceres, A. G. & Villaseca, P. (2002). Manual de procedimientos de identificación de vectores de leishmaniosis y enfermedad de Carrión. *Serie de Normas Técnicas, Instituto Nacional de Salud* (Lima, Perú), 36: 11– 8.
- Calenge, C. (2015). Analysis of habitat selection by animals. Version 1.8.18. (Software PC). <https://cran.r-project.org/web/packages/adehabitat/adehabitat.pdf>
- Cannova, D. C., Ramírez, M. P., Simons, M. I., Hernández, V., Jaimes, L., Linares, M. C. & Aguilar, C. M. (2011). Seroepidemiología de leishmaniasis visceral urbana: Barrio Los Próceres. Municipio Naguanagua, Estado Carabobo, Venezuela 2009. *Salus*, 15(2): 17–21.
- Carrasquilla, M. C. & Kaufman, P. E. (2015). Sand Fly. Recuperado el 3 de octubre de 2016, de http://entnemdept.ufl.edu/creatures/misc/flies/Lutzomyia_longipalpis.htm#ref
- Carvalho, G. M., Gontijo, C. M., Falcao, A. L. & Andrade-Filho, J. D. (2010). Study of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) collected in a Leishmania endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 47: 972–976.
- Casanova, C. (2001). A soil emergence trap for collections of Phlebotomine sandflies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96: 273–275.
- Casanova, C., Andrighetti, M. T. M., Sampaio, S. M. P., Marcoris, M. L. G., Colla-Jacques, F. E. & Prado, A. P. (2013). Larval breeding sites of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in visceral leishmaniasis endemic urban areas in Southeastern Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7(9): e2443.
- Castro, G. M. O. (1939). Hábitos de alguns flebotomos brasileiros. *Jornal de Comercio*, 112(81): 4.

- Chaniotis, B. N. (1967). The biology of California *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae) under laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*, 4: 221–233.
- Chaniotis, B. N. (1986). Successful colonization of the sandfly *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae), with enhancement of gonotrophic activity. *Journal of Medical Entomology*, 23: 163–166.
- Christensen, H. A. & Vasquez, A. M. (1983). The tree-buttress biotope: a pathobiocenose of *Leishmania braziliensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31: 243–251.
- Cochero, S., Anaya, Y., Díaz, Y., Paternina, M., Luna, A., Paternina, L. & Bejarano, E. E. (2007). Infección natural de *Lutzomyia cayennensis cayennensis* con parásitos tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Los Montes de María, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59(1): 35–39.
- Cordero, J., Mesén, F., Montero, M., Steward, J., Boshier, D., Chamberlain, J., Pennington, T., Hands, M., Hughes, C. & Detlefsen, G. (2003). Descripción de especies de árboles nativos de América central. Cordero, J. & Boshier, D. (Ed.), *Árboles de Centroamérica: Un manual para extensionistas*. (pp. 1 – 1079). Turrialba, Costa Rica: OFI/CATIE.
- Comer, J. A. & Tesh, R. B. (1991). Phlebotomine sand flies as vectors of vesiculoviruses: a review. *Parassitología*, 33, 143–150.
- Cortés, L. A. & Fernández, J. J. (2008). Especies de *Lutzomyia* en un foco urbano de leishmaniasis visceral y cutánea en El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. *Biomédica*, 28: 433–440.
- Coura-Vital, W., Reis, A. B., Reis, L. E., Braga, S. L., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. et al. (2013). Canine visceral leishmaniasis: incidence and risk factors for infection in a cohort study in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 197: 411–417.
- Coutinho, J. O. & Barretto, M. P. (1941). Dados bionômicos sobre o *Phlebotomus fischeri* Pinto, 1926 (Diptera, Psychodidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 1: 423–429.
- Dantas-Torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmanias) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 149: 139–146.

- Deane, L. M. (1956). *Leishmaniose visceral no Brasil: Estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará*. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária.
- Deane, L. M. & Deane, M. P. (1957). Observações sobre abrigos e criadouros de flebótomos no noroeste do Estado do Ceará. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 9: 225–246.
- Desjeux, P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95: 239–243.
- Desjeux, P. (2002). Urbanization as increasing risk factor in leishmaniasis. *Weekly Epidemiological Record*, 77(44): 365–72.
- Dougherty, M. J., Guerin, P. M. & Ward, R. D. 1995. Identification on ovoposition attractant for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in volatiles of faeces from vertebrates. *Physiological Entomology*, 2: 23–32.
- Dray, S., Dufour, A. & Thioulouse, J. (2016). Analysis of Ecological Data: Exploratory and Euclidean methods in Environmental sciences. Version 1.7-4. <https://cran.r-project.org/web/packages/ade4/ade4.pdf>
- El-Hossary, S. (2006). *Morphological characteristics for sand fly taxonomy*. Research and Training Center of diseases, Ain Shams University.
- Elnaiem, D. A. & Ward, R. D. (1990). An oviposition pheromone on the eggs of sandflies (Diptera: Psychodidae). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 456–457.
- Elnaiem, D. A. & Ward, R. D. (1991). Response of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* to an oviposition pheromone associated with conspecific eggs. *Medical and Veterinary Entomology*, 5: 87–91.
- Elnaiem, D. A., Ward, R. D. & Rees, H. H. (1991). Chemical factors controlling oviposition of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Parassitologia*, 33: 217–224.
- Elnaiem, D. A. & Ward, R. D. (1992a). Oviposition attractants and stimulants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 29: 5–12.

- Elnaiem, D. A. & Ward, R. D. (1992b). The thigmotropic Oviposition response of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to crevices. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 86: 425–430.
- Endris, R. G., Young, D. G. & Perkins, P. V. (1987). Ultrastructural comparison of egg surface morphology of five *Lutzomyia* species (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 24: 412–415.
- Essington, M. E. (2003). *Soil and water chemistry; an integrative approach*. Florida: CRC Press.
- Estrada, L. G., Flórez, F. & Bejarano, E. E. (2012). *Identificación de los criaderos naturales de especies del género Lutzomyia (Diptera: Psychodidae) en la ciudad de Sincelejo, departamento de Sucre*. Tesis para optar al título de Biología con énfasis en Biotecnología, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia.
- Feliciangeli, M. D. (2004). Natural breeding places of Phlebotomine Sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 18: 71–80.
- Ferreira, L. C., Deane, L. & Mangabeira, F. O. (1938). Sobre a biologia dos flebótomos das zonas de leishmaniose visceral ora em estudo no Pará. *O' Hospital*, 14: 1079–1082.
- Ferro, C., Pardo, R., Pérez, L. & Munstermann, L. (1996). Flebotomíneos de las áreas urbana y rural de Leticia, Amazonas. Implicaciones en Salud Pública. *Memorias XXIII Congreso Colombiano de Entomología SOCOLEN* (p 143). Cartagena, Colombia.
- Ferro, C., Pardo, R., Torres, M. & Morrison, A. C. (1997). Larval Microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis in Colombia. *Journal of Medical Entomology*, 34(6): 719–728.
- Ferro, C., López, M., Fuya, P., Lugo, L., Cordovez, J. M. & González, C. (2015). Spatial Distribution of Sand Fly Vectors and Eco-Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis Transmission in Colombia. *PLoS One*, 10(10): e0139391.
- Forattini, O. P. (1954). Algumas observações sobre a biologia dos flebótomos dos zonas de leishmaniose visceral ora em estudo do Estado de Pará. *O' Hospital*, 14: 3–6.

- Forattini, O. P. (1973). *Entomologia medica: Psychodidae, Phlebotominae, Leishmanioses, Bartonelose*. (Vol 4). Sao Paulo, Brasil: Ed. Edgard Blücher/Ed. Univ. S. Paulo.
- Foster, W. A., Tesfa-Yohannes, T. M., Teckle, T. (1970). Studies on leishmaniasis in Ethiopia. II Laboratory culture and biology of *Phlebotomus longipes* (Diptera: Psychodidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 64: 403–409.
- Galati, E. A. B. (2009). Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). Classificação, morfologia, terminologia e identificação de Adultos (Vol I). Apostila de Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. São Paulo: Universidade de São Paulo.
- Galati, E. A. B., Camara, T. N., Natal, D. & Chiaravalloti-Neto, F. (2015). Mudanças climáticas e saúde urbana. *Revista USP*, 107: 79–90.
- García, A. L., Parrado, R., Rojas, E., Delgado, R., Dujardin, J. C. & Reithinger, R. (2009). Leishmaniasis in Bolivia: comprehensive review and current status. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 704–711.
- Geoffroy, B., Dedet, J. P., Lebbe, J., Esterre, P. & Trape, J. F. (1986). Notes sur les relations des vecteurs de leishmaniose avec les essences forestières en Guyane Française. *Annales de parasitologie humaine et comparée*, 61: 483–490.
- Gómez-Romero, S. E. & Zambrano, P. (2012). Informe del evento Leishmaniasis hasta XIII periodo epidemiológico del año 2012. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Publica – Instituto Nacional de Salud. Informe Evento (pp 1 – 27). Bogotá, Colombia: Ministerio de Salud de Colombia.
- Gómez-Romero, S. E. (2013). Informe final Leishmaniasis, 2013. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Publica – Instituto Nacional de Salud. Informe Evento (pp 1 – 24). Bogotá, Colombia: Ministerio de Salud de Colombia.
- Gore, N. & Nicholls, S. (2006). Leishmaniasis un reto para la salud pública que exige concertación de voluntades y esfuerzos. *Biomédica*, 26.
- Hanson, W. J. (1961). The breeding places of *Phlebotomus* in Panama (Diptera: Psychodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 54:317–322.

- Hanson, W. J. (1968). *The immature stages of the family Phlebotominae in Panama (Diptera: Psychodidae)*. (Tesis Doctoral). University of Kansas, U.S.A.
- Holdridge, L. R. (1967). *Life zone ecology*. San José, Costa Rica: Tropical Science Center.
- IDEAM (2005). *Atlas Climatológico de Colombia*. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia. Bogotá, Colombia: Imprenta Nacional.
- Ibáñez-Bernal, S., Hernández-Xoliot, R. A. & Mendoza, F. (2006). Collections of Bruchomyiinae and Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) from the north-central portion of the State of Veracruz, Mexico, with the description of a new species. *Zootaxa*, 1270: 19–33.
- IGAC (1996). *Diccionario Geográfico de Colombia* (3ra ed). Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Bogotá, Colombia: Imprenta Nacional.
- Johnson, P. T. & Hertig, M. (1961). The rearing of *Phlebotomus* Sandflies (Diptera: Psychodidae). II-. Development and behavior of Panamanian Sandflies in laboratory culture. *Annals of the Entomological Society of America*, 54: 764–776.
- Kesari, S., Mandal, R., Kumar, V. & Das, P. (2014). Soil productivity of *Phlebotomus argentipes* and Its relation to physical and chemical properties: A laboratory based study. *International Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*, 5(4): 10–14.
- Killick-Kendrick, R. (1987). Breeding places of *Phlebotomus ariasi* in the Cevennes focus of leishmaniasis in the South of France. *Parassitología*, 29: 181–191.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, 4: 1–24.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sandflies. *Clinics in Dermatology*, 17, 279–289.
- Le Pont, F. & Pajot, F. X. (1980). La leishmaniose en Guyane Française. I. Etude de l'écologie et du taux d'infection naturelle du vecteur *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward et Fraiha 1977 en saison sèche. Considérations épidémiologiques. *Cah ORSTOM sér Ent Méd et Parasitol*, 28: 359–382.

- Lehane, M. (1991). *Biology of blood-sucking insects*. (2nd. ed.). London: Harper-Collins Academic.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N. & Gradoni, L. (2012). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27: 123–147.
- Martín-Sánchez, J., Navarro-Mari, J. M., Pasquau-Liaño, J., Salomón, O. D., Morillas-Márquez, F. (2004). Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in a Spanish patient in Argentina: What is the origin of the infection? Case report. *BMC Infectious Diseases*, 4: 20.
- Martínez, L., Rebollo, J. A., Luna, A. L., Cochero, S. & Bejarano, E. E. (2010). Molecular identification of the parasites causing cutaneous leishmaniasis on the Caribbean coast of Colombia. *Parasitology Research*, 106: 647–652.
- Martínez-Suárez, C., Almanza-Rodríguez, C. & Bejarano, E. E. (2012). Estimación del tiempo de desarrollo de *Lutzomyia evansi* bajo condiciones experimentales. *Revista Científica Salud Uninorte*, 28(2): 201–208.
- Microsoft Office (2016). Microsoft Excel. Versión 16.0. (Software PC). Microsoft Corp.
- Minter, J. L. (1919). Preliminary report on an investigation into the breeding places of Phlebotomies (*papatasi* and *minutes*) in Lahore. *Indian Journal of Medical Research*, 6: 452–461.
- Moncaz, A., Kirstein, O., Gebresellassie, A., Lemma, W., Yared, S., Gebre-Michael, T. et al. (2014a). Characterization of breeding sites of *Phlebotomus orientalis* – The vector of visceral leishmaniasis in northwestern Ethiopia. *Acta Tropica*, 139: 5–14.
- Moncaz, A., Kirstein, O., Gebresellassie, A., Lemma, W., Gebre-Michel, T., Balkew, M. et al. (2014b). *Sergentomyia* spp.: Breeding sites in vertisols and peri-domestic habitats in North West Ethiopia. *Acta Tropica*, 137: 68–94.
- Montoya-Lerma, J., Cadena-Peña, H. & Jaramillo-Salazar, C. (1998). Rearing and Colonization of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a vector of Visceral leishmaniasis in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93(2): 263–268.

- Montoya-Lerma, J. & Ferro, C. (1999). Flebótomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. Amat, G., Andrade, M. G. & Fernández, F. (Eds). *Insectos de Colombia*, vol II (pp 211 – 245). Bogotá: Centro Editorial Javeriano.
- Moya, S. L., Giuliani, M. G., Manteca-Acosta, M., Salomón, O. D. & Liotta, D. J. (2015). First description of *Migonemyia migonei* (França) and *Nyssomyia withmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina. *Acta Tropica*, 152: 181–184.
- Nieves, E., Ribeiro, A. & Brazil, R. (1997). Physical factors influencing the oviposition of *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae) in laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 92(6): 733–737.
- Oliveira, C. D. L., Morais, M. H. F. & Machado-Coelho, G. L. L. (2008). Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. *Cadernos de Saúde Pública*, 24: 2953–2958.
- OPS (2016). Leishmaniasis: Informe Epidemiológico de Las Américas. Oficina regional de la Organización Mundial de la Salud – OMS. *Informe Leishmaniasis no. 4 – Julio* (pp 1 – 7). Washington D.C.: Organización Panamericana de la Salud.
- PAHO (2014). Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. Regional Office of the World Health Organization - WHO. *Report Leishmaniasis no. 2 – June* (pp 1 – 4). Washington D. C.: Pan American Health Organization.
- Pardo, R. H., Farieta, S., Munstermann, L. & Ferro, C. (1996). Estudio preliminar de los flebótomos de Villeta y Quebradanegra, Cundinamarca: sus implicaciones en salud pública. *Biomédica*, 16: 293–302.
- Pardo, C. P., Del Campo, P. C. & Torres, C. J. (2015). Combination of factorial methods and cluster analysis. Version 1.1.2. (Software PC). <https://cran.r-project.org/web/packages/FactoClass/FactoClass.pdf>
- Parras, M. A., Rosa, J. M., Szelag, E. A. & Salomón, O. D. (2012). Identification of the natural breeding sites of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), potential vectors of

- leishmaniasis, in the province of Chaco, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(4): 550–552.
- Paternina, L. E., Verbel-Vergara, D., Romero-Ricardo, L., Pérez-Doria, A., Paternina-Gómez, M., Martínez, L. & Bejarano, E. E. (2015). Evidence for anthrophily in five species of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification of bloodmeals. *Acta Tropica*, 153: 86–92.
- Pifano, F. (1941). La leishmaniasis tegumentaria en el Estado Yaracuy, Venezuela. *Gaceta Médica de Caracas*, 48: 292–99.
- Poché, R. M., Garlapati, R., Dia-Eldin, A., Elnaiem, A., Perry, D. & Poché, D. (2011). The role of Palmyra palm trees (*Borassus flabellifer*) and sand fly distribution in northeastern India. *Journal of Vector Ecology*, 37(1): 148–153.
- Polseela, R., Apiwathnasorn, C. & Samung, Y. (2011). Seasonal distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Tham Phra Phothisat temple, Saraburi province, Thailand. *Tropical Biomedicine*, 28(2): 366 – 375.
- Quantum GIS Development Team (2016). Quantum GIS Geographic Information System. Version 2.16.0. (Software PC). Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>.
- R Development Core Team. (2008). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Version 3.3.1. (Software PC). R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.r-project.org>.
- Ready, P. D. (1979). Factors affecting egg production of laboratory – bred *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 16: 413–423.
- Rodríguez, J., Pérez-Doria, A., Romero-Ricardo, L., Vergara, J. G., Montesino, A. M., Martínez, L. et al. (2016). Household environment characteristics and abundance of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) in four peri-urban areas of the Colombian Caribbean. *In Press*.
- Rutledge, L. C. & Mosser, H. L. (1972). Biology of immature sandflies (Diptera: Psychodidae) at the bases of tree in Panama. *Environmental Entomology*, 1: 300–309.

- Rutledge, L. C. & Ellenwood, D. A. (1975a). Production of phlebotomine sandflies on the open forest floor in Panama: The species complement. *Environmental Entomology*, 4: 71–77.
- Rutledge, L. C. & Ellenwood, D. A. (1975b). Production of phlebotomine sandflies on the open forest floor in Panama: phytologic and edaphic relations. *Environmental Entomology*, 4: 83–89.
- Rutledge, L. C., Walton, B. C., Ellenwood, D. A. & Correa, M. A. (1976). A Transect Study of Sand Fly Populations in Panama (Diptera, Psychodidae). *Environmental Entomology*, 5: 1149–1154.
- Salomón, O. D., Quintana, M. G. & Zaidenberg, M. (2008). Urban distribution of Phlebotominae in a cutaneous leishmaniasis focus, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103: 282–287.
- Sánchez-García, L., Berzunza-Cruz, M., Becker-Fausser, I. & Rebollar-Tellez, E.A. (2010). Sandflies naturally infected by *Leishmania (L.) mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104: 406–411.
- Sandoval, C., Angulo, V., Gutiérrez, R., Muñoz, G. & Ferro, C. (1998). Especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) posibles vectores de leishmaniasis en la ciudad de Bucaramanga, Santander, Colombia. *Biomédica*, 18(2): 161–168.
- Sangiorgi, B., Miranda, D. N., Oliveira, D. F., Santos, E. P., Gomes, F. R., Santos, E. O. et al. (2012). Natural breeding places for Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Semiarid region of Bahia State, Brazil. *Journal of Tropical Medicine*, 2: 5
- Schlein, Y., Yuval, B. & Jacobson, R. L. (1989). Leishmaniasis in the Jordan Valley: differential attraction of dispersing and breeding sites populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to manure and water. *Journal of Medical Entomology*, 26(5): 411–413.
- Scorza, J. V. & Ortiz, I. (1960). On microclimatic conditions of the habitats of certain sandflies species (Diptera: Psychodidae) from Venezuela. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*, 11: 433–440.

- Scorza, J. V. & Rojas, E. (1990). La leishmaniasis tegumentaria venezolana: problemática contemporánea en el estado Trujillo. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental*, 30: 14–16.
- Sherlock, I. A. (2003). A importância dos flebotomíneos. Rangel, E. F. & Lainson, R (Eds.). *Flebotomíneos do Brasil* (pp15 – 21). Rio do Janeiro: Editora Fiocruz.
- Sierra, D., Ochoa, M., Calle, J. I., García, G., Colorado, D. & Vélez, I. D. (2006). *Leishmania (Leishmania) mexicana* en el corregimiento de San Matías, municipio de Gómez Plata, Antioquia, Colombia. *Biomédica*, 26(1): 232–235.
- Singh, R., Lal, S. & Saxena, V. K. (2008). Breeding ecology of visceral leishmaniasis vector sandfly in Bihar state of India. *Acta Tropica*, 107: 117–120.
- SIVIGILA/INS (2014). Semana epidemiológica número 50 de 2014. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública – Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal (pp 1 – 52). Bogotá, Colombia: Ministerio de Salud de Colombia.
- SIVIGILA/INS (2015). Semana epidemiológica número 52 de 2015. Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública – Instituto Nacional de Salud. *Boletín Epidemiológico Semanal* (pp 1 – 72). Bogotá, Colombia: Ministerio de Salud de Colombia.
- Souza, T. L., Figueiredo, F. B., Almeida, A. B., Benigno, C. V., Pontes, C. S. & Souza, M. B. (2014). Natural breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) on Marambaia Island, Rio de Janeiro State, Brazil. *Acta Tropica*, 136: 104–107.
- Sparks, D. L. (2003). *Environmental soil chemistry*. San Diego, Ca: Academic Press.
- Thatcher, V. E. (1968). Arboreal sites of phlebotomine sandflies in Panama. *Annals of the Entomological Society of America*, 61(5): 1141–1143.
- Theodor, O. (1936). On the relation of *Phlebotomus papatasi* to the temperature and humidity of the environment. *Bulletin of Entomological Research*, 27: 653–671.
- Travi, B. L., Montoya, J., Solarte, Y., Lozano, L. & Jaramillo, C. (1988). Leishmaniasis in Colombia. I. Studies on the phlebotomine fauna associated with endemic foci in the Pacific Coast region. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 39: 261–266.

- Travi, B. L., Vélez, I. D., Brutus, L., Segura, I., Jaramillo, C. D. & Montoya, J. (1990). *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 676–677.
- Travi, B. & Montoya-Lerma, J. (1994). *Manual de Entomología Médica para Investigadores de América Latina* (pp 1 – 280). Cali, Colombia: Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas fundación CIDEIM.
- Travi, B. L., Adler, G. H., Lozano, M., Cadena, H. & Montoya-Lerma, J. (2002). Impact of habitat degradation on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of Tropical Dry Forest in Northern Colombia. *Journal of Medical Entomology*, 39(3): 451–456.
- Tufan, Z., Tasyaran, M.A. & Guven, T. (2013). Sandfly Fever: A Mini Review. *Virology & Mycology*, 2: 109.
- Vargas, G., Álvarez, G., Wolff, M., López, Y., Gómez, M. (1990). Estudio de un foco de leishmaniasis en dos barrios de Remedios, Antioquia. *Boletín Epidemiológico de Antioquia*, 16: 48–59.
- Vélez, I. D., Hendrickx, E., Robledo, S. M. & Agudelo, N. P. (2001). Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. *Cadernos de Saúde Pública*, 17(1): 17 –180.
- Vidyashankar, C. & Noel, G. J. (2002). Leishmaniasis. *eMedicine Journal*, 3: 1–19.
- Vieira, V. P., Ferreira, A. L. & Falqueto, A. (1999). Pesquisa dos criadouros de flebotomíneos no ambiente peridomiciliar, em área endêmica de leishmaniose tegumentar (LT) no Estado do Espírito Santo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(1): 31–32.
- Vieira, V. P., Ferreira, A. L., dos Santos, C. B., Leite, G. R., Ferreira, G. E. M. & Falqueto, A. (2012). Peridomestic breeding sites of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in Southeastern Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(6): 1089–1093.
- Vivero, R. J., Bejarano, E. E., Pérez-Doria, A., Flórez, F., Estrada, L. G., Torres, C. & Muskus, C. (2009). Nuevos registros de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), con el hallazgo de

- Lutzomyia longipalpis* (Lutz y Neiva, 1912), en los alrededores de la ciudad de Sincelejo, Colombia. *Biota Neotropica*, 9(4): 277–280.
- Vivero, R. J., Ortega, E., Aparicio, Y., Torres, C., Muskus, C. & Bejarano, E. E. (2013). Flebotomíneos adultos e inmaduros (Diptera: Psychodidae): registros para el Caribe colombiano. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 53(2): 157–164.
- Vivero, R. J., Torres-Gutiérrez, C., Bejarano, E. E., Cadena-Peña, H., Estrada, L. G., Flórez, F. et al. (2015). Study on natural breeding sites of sand flies (Diptera: Phlebotominae) in areas of *Leishmania* transmission in Colombia. *Parasites & Vectors*, 8: 116.
- Walsh, M. (2011). Leishmaniasis. Recuperado el 29 de septiembre de 2016, de <http://www.infectionlandscapes.org/2011/05/leishmaniasis.html>
- WHO (2010). Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010. *WHO technical report series no. 949* (pp 1 – 202). Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Wilson, R. (2014). *Bird and Wildlife photography*. Recuperado el 23 de septiembre de 2016, de http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.htm 1.
- Young, D. G. & Duncan, M. A. (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, 54, 1–881.
- Zambrano-Hernández, P., Ayala-Sotelo, M., Fuya-Oviedo, P., Montenegro-Puentes, C. A., Aya-Vanegas, N. M., Aguilera-Jaramillo. et al. (2015). Brote urbano de leishmaniasis visceral en Neiva, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 17(4): 514–527.
- Zambrano, P., Ayala-Sotelo, M., Fuya-Oviedo, P., Barraza, O. C. & Rodríguez-Toro, G. (2016). Cartagena: nuevo foco de leishmaniasis visceral urbana en Colombia. *Revista Ciencia en Desarrollo*, 7(1): 83–91.
- Zech, W., Senesi, N., Guggenberger, G., Kaiser, K., Lehman, J., Miano, T. et al. (1997). Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, 79(1197): 117–161.

10. ANEXOS

Anexo 1. Especies vegetales identificadas en los barrios El Tolima, El Oasis, 4 de octubre, La Pradera, ciudadela Villa Paz y San José durante los años 2013 - 2015

Nombre Común: Nombre científico	Familia	Barrios		
		El Tolima, El Oasis y 4 de octubre	La Pradera y Villa Paz	San José
Sin nombre: <i>Bauhinia</i> sp	FABACEAE	X		X
Olivo: <i>Capparis odoratissima</i>	CAPPARADACEAE	X		
Uvero: <i>Coccoloba</i> sp	POLYGONACEAE	X	X	X
Sin nombre: <i>Coccoloba</i> sp1	POLYGONACEAE	X		
Vara de humo: <i>Cordia alliodora</i>	BORAGINACEAE	x		
Uvito: <i>Cordia dentata</i>	BORAGINACEAE	X	X	X
Sin nombre: <i>Cordia</i> sp1	BORAGINACEAE	X		X
Sin nombre: <i>Cordia</i> sp2	BORAGINACEAE	X		
Totumo: <i>Crescentia cujete</i>	BIGNONIACEAE	X	X	X
Melina: <i>Gmelina arborea</i>	LAMIACEAE	X		
Guácimo: <i>Guazuma ulmifolia</i>	MALVACEAE	X	X	X
Mora: <i>Maclura tinctoria</i>	MORACEAE	X		
Sin nombre: <i>Nectandra</i> sp	LAURACEAE	X		
Sin nombre: No determinado	MALVACEAE	x		
Sin nombre: <i>Piper</i> sp	PIPERACEAE	X	X	X
Trébol: <i>Platymiscium pinnatum</i>	FABACEAE	X		
María Angola: <i>Randia armata</i>	RUBIACEAE	X	X	X
Roble rosado: <i>Tabebuia rosea</i>	BIGNONIACEAE	X		
Huevo de fraile: <i>Tabernaemontana</i> sp	APOCYNACEAE	X		X
Cobalonga: <i>Thevetia peruviana</i>	APOCYNACEAE	X		X
Vara santa: <i>Triplaris americana</i>	POLYGONACEAE	X		
Bledo: <i>Achyranthes</i> sp	AMARANTHACEAE	x		
Sin nombre: <i>Commelina erecta</i>	COMMELINACEAE	X		
Sin nombre: <i>Malvaviscus</i> sp1	MALVACEAE	x		

Sin nombre: <i>Momordica charantia</i>	CUCURBITACEAE	X		
Anamú: <i>Petiveria alliacea</i>	PHYTOLACCACEAE	x		
Uña de gato: <i>Pithecellobium</i> sp	FABACEAE	X		
Sin nombre: <i>Serjania</i> sp	SAPINDACEAE	X	X	
Lulo de monte: <i>Solanum</i> sp	SOLANACEAE	X		X
Sin nombre: <i>Stachytarpheta</i> sp	VERBENACEAE	X		
Carbonero: <i>Caesalpinia ebano</i>	FABACEAE	X	X	
Sin nombre: <i>Anonaceae</i> sp	ANNONACEAE		X	
Carreto: <i>Aspidosperma</i> aff. <i>Polyneuron</i>	APOCYNACEAE		X	
Sin nombre: <i>Asteraceae</i> sp	ASTERACEAE		X	X
Santa Cruz: <i>Astromium graveolens</i>	ANACARDIACEAE	X	X	X
Indio en cuero: <i>Bursera simarouba</i>	BURSERACEAE		X	
Fruto de burro: <i>Capparis pulcherrima</i>	CAPPARADACEAE		X	
Sin Nombre: <i>Cnidoscolus</i> sp	EUPHORBIACEAE		X	
Muñeco: <i>Cordia collococca</i>	BORAGINACEAE	X	X	X
Sin nombre: <i>Croton</i> sp	EUPHORBIACEAE		X	
Manao: <i>Dilodendron</i> sp	SAPINDACEAE		X	
Sin nombre: <i>Fabaceae</i> sp	FABACEAE		X	
Ceiba de leche: <i>Hura crepitans</i>	EUPHORBIACEAE	X	X	
Balsamito: <i>Lonchocarpus</i> sp	FABACEAE		X	
Cereza de monte: <i>Malpighia puniceifolia</i>	MALPIGHIACEAE		X	
Gucharaco: <i>Matayba scrobiculata</i>	SAPINDACEAE		X	
Nim: <i>Melia azederacta</i>	MELIACEAE		X	
Changao: <i>Pithecellobium platylobum</i>	FABACEAE		X	
Sangre de drago: <i>Pterocarpus acapulcensis</i>	FABACEAE		X	
Majagua: <i>Senna</i> sp	FABACEAE	X	X	
Jobo: <i>Spondias mombin</i>	ANACARDIACEAE		X	X
Camajón: <i>Sterculia apetala</i>	MALVACEAE	X	X	
Polvillo: <i>Tabebuia bilbergii</i>	BIGNONIACEAE		X	X
Sin nombre: <i>Trichilia</i> aff. <i>Hirta</i>	POLYGONACEAE		X	
Escobilla: <i>Sida acuta</i>	MALVACEAE	X	X	X

Dormidera: <i>Mimosa pudica</i>	MIMOSACEAE		X	X
Guanacón: <i>Annona purpurea</i>	ANNONACEAE			X
Cañandonga: <i>Cassia grandis</i>	FABACEAE	X		X
Bajagua: <i>Pseudobombax septenatum</i>	MALVACEAE		X	X
Sin nombre: <i>Trichilia</i> sp	MELIACEAE			X
Mamon: <i>Melicoccus bijugatus</i>	SAPINDACEAE	X		X
Limoncillo: <i>Swinglea glutinosa</i>	RUTACEAE	X		X
Campano: <i>Samanea saman</i>	FABACEAE	X		
Aromo: <i>Acacia farnesiana</i>	FABACEAE		X	
Mango: <i>Mangifera indica</i>	ANACARDIACEAE	X	X	X
Coco: <i>Cocos nicifera</i>	ARECACEAE		X	
Achiote: <i>Bixa Orellana</i>	BIXACEAE	X		
Cedro: <i>Cedrela odorata</i>	MELIACEAE			X
Látigo: <i>Machaerium arboreum</i>	FABACEAE	X		
Matarratón: <i>Gliricidia sepium</i>	FABACEAE	X	X	X
Neem: <i>Azadirachta indica</i>	MELIACEAE		X	X
Ciruella: <i>Spondias purpurea</i>	ANACARDIACEAE		X	X
Teca: <i>Tectona grandis</i>	LAMIACEAE	X		
Chicho: <i>Albizia</i> sp	MIMOSACEAE		X	
Guacamayo: <i>Albizia niopoides</i>	MIMOSACEAE			X
Orejero: <i>Enterolobium cyclocarpum</i>	FABACEAE			X
Pata de vaca: <i>Bauhinia forficata</i>	FABACEAE	X		

Anexo 2. Variables ambientales y fisicoquímicas de los sitios de cría naturales de *Lu. evansi*, de otras especies y de microambientes naturales negativos en Ovejas, utilizados para el análisis estadístico

Variables físicas y químicas	Sitios de cría Levansi					Sitios de cría Lotras					Microhábitats Lnegativa				
	η	DE	Min	Max	M_e	η	DE	Min	Max	M_e	η	DE	Min	Max	M_e
Temp. °C <i>in situ</i>		2,4	23,1	34,6	30,3		2,03	25,7	34,6	30,7		1,43	29,3	33	31,1
HR% <i>in situ</i>		8,28	64	94	77		7,28	64	94	77		5,3	63	77	72
pH		0,31	6,55	7,74	7,43		0,32	6,25	7,74	7,39		0,15	7,42	7,88	7,63
Materia Orgánica		1,5	0,76	7,73	3,27		2,09	0,76	10,1	3,08		0,86	1,44	3,97	2,97
Fósforo		51,7	35,1	232	143		52,35	34,62	232,3	127		54,08	11,58	178,6	100,7
C.I.C		4,35	11,5	28,5	25		4,22	11,5	31,5	23		2,96	18,5	27	25
Calcio		8,06	6	38	14,8		8,15	5,2	37	15,3		2,61	12	20	16
Magnesio		3,14	2	15	6,34		2,16	2	10	5,5		2,22	5	11,67	7,6
Potasio		0,16	0,09	0,9	0,28		0,19	0,03	0,9	0,28		0,04	0,14	0,26	0,22
Sodio	32	0,33	1,26	2,77	2,2	36	0,3	1,26	2,65	2,16	7	0,32	1,8	2,6	2,4
Arena		16	29,9	84,9	49,33		17,19	29,87	86,67	50,9		17,06	33,33	80	58,33
Arcilla		7,2	4,6	35	13,33		6,43	4,6	25	11		14,06	2,5	41,67	18,33
Limo		11,4	10,5	52,6	35,3		11,9	8,33	52,63	31,3		5,87	17,5	33,34	25
Saturación de Ca		13	29,2	78,6	60,44		14,73	22	77,04	62,8		1,92	57,69	62,27	60,05
Saturación de Mg		9,02	11,1	46	21,7		6,14	11,11	38,43	20,5		3,74	22,22	33,91	28,51
Saturación de Na		1,86	4,2	11,2	8,62		2	4,36	12	8,8		0,85	7,27	9,93	8,92
Relación Ca/Mg		1,3	0,97	5,78	3		1,31	1,13	6,01	2,95		0,3	1,71	2,6	2,16
Cond. Eléctrica		721	270	2880	961		470	247	2270	925		277,4	476	1130	863
Salinidad		0,43	0	1,5	0,2		0,28	0	1,1	0,2		0,38	0	1,1	0,2

Anexo 3. Matriz de correlación de Spearman

Variables	N° inm	T°C in situ	HR% in situ	pH	Mat Orgánica	Fósforo	CIC	Calcio	Mg	Potasio	Sodio	Arena	Arcilla	Limo	Satur. Ca	Satur. Mg	Satur. Na	Relac. Ca/Mg	Cond. Elect	Salinidad
N° inm	1	-0,029	0,076	-0,199	0,168	0,224	0,001	0,046	-0,214	0,111	-0,041	-0,197	0,195	0,234	0,100	-0,205	-0,004	0,227	0,117	0,083
T°C in situ	-0,029	1	-0,739	0,113	0,184	-0,261	0,206	0,178	0,199	0,113	-0,067	0,094	0,023	-0,168	0,122	0,188	-0,302	-0,088	-0,093	0,042
HR% in situ	0,076	-0,739	1	-0,005	-0,108	0,387	-0,301	-0,065	-0,247	0,069	-0,034	-0,084	-0,042	0,227	0,045	-0,221	0,199	0,217	0,045	-0,098
pH	-0,199	0,113	-0,005	1	-0,191	0,229	0,054	0,476	0,062	0,210	-0,240	-0,127	0,034	0,194	0,536	-0,128	-0,399	0,362	-0,371	-0,349
Mat Orgán	0,168	0,184	-0,108	-0,191	1	0,139	0,355	-0,016	0,276	0,446	0,475	-0,253	0,305	0,249	-0,216	0,248	-0,062	-0,289	0,423	0,395
Fósforo	0,224	-0,261	0,387	0,229	0,139	1	0,087	0,382	0,014	0,411	0,182	-0,142	0,030	0,291	0,343	-0,193	-0,219	0,283	0,273	0,078
C.I.C.	0,001	0,206	-0,301	0,054	0,355	0,087	1	0,568	0,592	0,527	0,619	-0,611	0,577	0,552	0,187	0,146	-0,542	-0,027	0,566	0,498
Calcio	0,046	0,178	-0,065	0,476	-0,016	0,382	0,568	1	0,435	0,474	0,144	-0,533	0,323	0,536	0,833	-0,192	-0,840	0,546	0,182	0,076
Magnesio	-0,214	0,199	-0,247	0,062	0,276	0,014	0,592	0,435	1	0,275	0,553	-0,378	0,289	0,330	0,019	0,679	-0,482	-0,433	0,507	0,417
Potasio	0,111	0,113	0,069	0,210	0,446	0,411	0,527	0,474	0,275	1	0,415	-0,614	0,523	0,640	0,315	-0,086	-0,409	0,178	0,373	0,214
Sodio	-0,041	-0,067	-0,034	-0,240	0,475	0,182	0,619	0,144	0,553	0,415	1	-0,448	0,554	0,333	-0,201	0,467	0,059	-0,404	0,863	0,766
Arena	-0,197	0,094	-0,084	-0,127	-0,253	-0,142	-0,611	-0,533	-0,378	-0,614	-0,448	1	-0,836	-0,830	-0,341	-0,011	0,392	-0,185	-0,507	-0,408
Arcilla	0,195	0,023	-0,042	0,034	0,305	0,030	0,577	0,323	0,289	0,523	0,554	-0,836	1	0,601	0,149	0,161	-0,138	-0,009	0,500	0,410
Limo	0,234	-0,168	0,227	0,194	0,249	0,291	0,552	0,536	0,330	0,640	0,333	-0,830	0,601	1	0,377	-0,058	-0,411	0,250	0,448	0,294
Satur. Ca	0,100	0,122	0,045	0,536	-0,216	0,343	0,187	0,833	0,019	0,315	-0,201	-0,341	0,149	0,377	1	-0,481	-0,640	0,813	-0,100	-0,175
Satur. Mg	-0,205	0,188	-0,221	-0,128	0,248	-0,193	0,146	-0,192	0,679	-0,086	0,467	-0,011	0,161	-0,058	-0,481	1	0,168	-0,858	0,371	0,337
Satur. Na	-0,004	-0,302	0,199	-0,399	-0,062	-0,219	-0,542	-0,840	-0,482	-0,409	0,059	0,392	-0,138	-0,411	-0,640	0,168	1	-0,406	0,014	0,068
Relac. Ca/Mg	0,227	-0,088	0,217	0,362	-0,289	0,283	-0,027	0,546	-0,433	0,178	-0,404	-0,185	-0,009	0,250	0,813	-0,858	-0,406	1	-0,298	-0,320
Cond. Elect	0,117	-0,093	0,045	-0,371	0,423	0,273	0,566	0,182	0,507	0,373	0,863	-0,507	0,500	0,448	-0,100	0,371	0,014	-0,298	1	0,879
Salinidad	0,083	0,042	-0,098	-0,349	0,395	0,078	0,498	0,076	0,417	0,214	0,766	-0,408	0,410	0,294	-0,175	0,337	0,068	-0,320	0,879	1

Anexo 4. Función discriminante de clasificación entre los microhábitats naturales Levansi, Lotras y Lnegativa

	Levansi	Negativa	Otras
Intercepción	-2182,665	-2263,599	-2168,604
Nº inmaduros	-0,258	-0,599	-0,292
Temp. °C <i>in situ</i>	15,257	15,125	15,308
HR% <i>in situ</i>	7,711	7,780	7,746
pH	285,723	292,923	283,898
Materia Orgánica (%)	-6,232	-6,469	-5,923
Fósforo	-0,436	-0,452	-0,443
C.I.C.	13,745	13,857	13,894
Calcio	20,926	20,930	20,883
Magnesio	-29,396	-29,381	-28,850
Potasio	94,416	80,363	93,071
Sodio	-139,642	-119,672	-139,285
Arena	7,397	7,329	7,300
Arcilla	8,458	8,529	8,337
Limo	2,455	2,307	2,329
Saturación de Ca	-6,601	-6,555	-6,522
Saturación de Mg	11,619	11,581	11,321
Saturación de Na	49,614	50,237	50,245
Relación Ca/Mg	29,631	27,729	28,822
Cond. Eléctrica	0,078	0,062	0,077
Salinidad	20,163	31,224	18,101