



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO PROFESIONAL
ASIGNATURA: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



**DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y PREVALENCIA DE *Lutzomyia* spp. (Diptera:
Psychodidae) COLECTADOS EN LA COMUNIDAD LAS TRINCHERAS,
MUNICIPIO NAGUANAGUA, ESTADO CARABOBO, 2023**

Autores:

Alfred J. González R. C.I.: V-24.329.292

Erika J. Pereira Y. C.I.: V-21.476.942

Stefany A. Toledo R. C.I.: V-29.724.049

Tutor: MSc. Diana Graterol

Co-Tutor: Dra. Elizabeth Ferrer

Asesora metodológica: Dra. Yolima Fernández

Naguanagua, Octubre 2.024



ACTA DE EVALUACIÓN

Quienes suscriben, miembros del Jurado designado por la Coordinación de la Asignatura Trabajo de Investigación, para evaluar el trabajo titulado: **“DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y PREVALENCIA DE *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) COLECTADOS EN LA COMUNIDAD LAS TRINCHERAS, MUNICIPIO NAGUANAGUA, ESTADO CARABOBO, 2023”**, realizado por los estudiantes: **Alfred J. González R., Erika J. Pereira Y. y Stefany A. Toledo R.**, titulares de la Cédula de Identidad: V-24.329.292, V-21.476.942 y V-29.724.049, respectivamente y tutorado por las Profesoras: **Diana Graterol y Elizabeth Ferrer**, titulares de la Cédula de Identidad V-14.999.305 y V-7.101.850 respectivamente. Hacemos de su conocimiento que hemos actuado como jurado evaluador del informe escrito, presentación y defensa del citado trabajo. Consideramos que reúne los requisitos de mérito para su **APROBACIÓN**.

En fe de lo cual se levanta esta Acta, en Naguanagua a los 22 días del mes de octubre del año dos mil veinticuatro.

Prof. Yolima Fernández
C.I: 13.382.234
Jurado Principal

Prof. Marjetta Díaz
C.I: 9.989.298
Jurado Principal

Prof. Amanda De Lima
C.I: 18.956.201
Jurado Principal



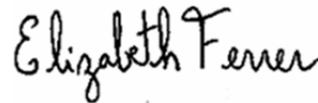
CONSTANCIA DE CERTIFICACIÓN DE LOS TUTORES

Por medio de la presente certificamos que hemos tenido conocimiento y asesoramos el Trabajo de Investigación titulado: **DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y PREVALENCIA DE *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) COLECTADOS EN LA COMUNIDAD LAS TRINCHERAS, MUNICIPIO NAGUANAGUA, ESTADO CARABOBO, 2023**, desde su inicio hasta su culminación. El mismo fue realizado por: **Alfred J. González R. C.I.: V-24.329.292**, **Erika J. Pereira Y. C.I.: V-21.476.942** y **Stefany A. Toledo R. C.I.: V-29.724.049**. Consideramos que el presente estudio, reúne todos los requisitos suficientes para ser sometido a evaluación.



MSc. Diana I. Graterol R.

C.I.: V-14.999.305



Dra. Elizabeth Ferrer J.

C.I.: V-7.101.850



ACTA DE EVALUACIÓN

Quienes suscriben, miembros del Jurado designado por la Coordinación de la Asignatura Trabajo de Investigación, para evaluar el trabajo titulado: **“DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y PREVALENCIA DE *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) COLECTADOS EN LA COMUNIDAD LAS TRINCHERAS, MUNICIPIO NAGUANAGUA, ESTADO CARABOBO, 2023”**, realizado por los estudiantes: **Alfred J. González R., Erika J. Pereira Y. y Stefany A. Toledo R.**, titulares de la Cédula de Identidad: V-24.329.292, V-21.476.942 y V-29.724.049, respectivamente y tutorado por las Profesoras: **Diana Graterol y Elizabeth Ferrer**, titulares de la Cédula de Identidad V-14.999.305 y V-7.101.850 respectivamente. Hacemos de su conocimiento que hemos actuado como jurado evaluador del informe escrito, presentación y defensa del citado trabajo. Consideramos que reúne los requisitos de mérito para su **APROBACIÓN**.

En fe de lo cual se levanta esta Acta, en Naguanagua a los 22 días del mes de octubre del año dos mil veinticuatro.

Prof. Yolima Fernández
C.I: 13.382.234
Jurado Principal

Prof. Marietta Díaz
C.I: 9.489.298
Jurado Principal

Prof. Amanda De Lima
C.I: 18.956.201
Jurado Principal

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios Todopoderoso quien nos dio vida, fe, fortaleza, salud, sabiduría e inteligencia para poder lograr este sueño tan importante en nuestras vidas y que tanto anhelamos, el cual es culminar nuestros estudios universitarios y ser unos excelentes profesionales. Él ha sido nuestra guía por el camino del bien, instruyéndonos y llevándonos de su mano, permitiéndonos levantarnos cuando estuvimos débiles, por Él miramos al horizonte con la esperanza de que llegaríamos a nuestra meta.

A nuestros padres, quienes nos enseñaron desde pequeños a luchar para alcanzar nuestras metas y aunque algunos de ellos no se encuentren en vida con nosotros éste triunfo les pertenece a ellos. Gracias por haber fomentado en todos, el deseo de superación y el anhelo del triunfo en la vida.

A todos nuestros seres queridos hermanos (as), tíos (as), primos (as), abuelos (as), esposos (as), novio (as), amigos (as) y profesores que como motores de nuestra vida han contribuido con su apoyo incondicional a que cada día seamos unas mejores personas y profesionales.

Mil palabras no serían suficientes para agradecerles su ayuda, comprensión y sus consejos en los momentos más difíciles.

Gracias por haber creído en nosotros, por sacarnos adelante dándonos ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes hoy podemos ver esta meta alcanzada pues siempre estuvieron impulsándonos en los momentos más complejos de nuestra carrera, y ello nos hizo avanzar hasta el final. Esto es por ustedes por lo que valen, porque admiramos su fortaleza y por lo que han hecho de nosotros.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro más sincero y especial agradecimiento a nuestra tutora MSc. Diana I. Graterol R por todo su interés y apoyo incondicional recibido, por su dedicación, paciencia y entrega para transmitirnos sus conocimientos. Por su gran amor a la docencia e investigación, y por la gran contribución que hace al país formándonos y guiándonos a lo largo de nuestra carrera. Además de sus valiosas críticas y recomendaciones en la revisión de la tesis.

También queremos agradecer a la Dra. Elizabeth Ferrer J. Co-Tutora por su asesoría, vastos conocimientos, y opiniones acertadas aportadas para la realización de la presente tesis, pero sobre todo nuestra gran admiración por la calidad humana que tiene, la misma que le permite desempeñarse como una excelente profesional.

Estos agradecimientos también son para el técnico entomólogo Arturo Bravo y la Prof. Karem Flores por su apoyo, paciencia, colaboración y asesoría para la consecución de este trabajo, especialmente en la práctica para los métodos de recolección de flebótomos y la identificación de los mismos. De quienes aprendimos mucho y nos enriquecieron con sus enseñanzas de investigadores. Sin ustedes esto no hubiera sido posible.

Igualmente, al Director de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT) Rafael Fernández, la Prof. Francys Pérez y la Auxiliar Wanda Lucena quienes prestaron toda su colaboración en las instalaciones del laboratorio en esta dependencia, para el procesamiento de una gran parte de las muestras dándonos así la oportunidad de cumplir con la realización de la tesis.

A todos los colaboradores que hacen vida en el Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP) y el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (Instituto BIOMED) pues de alguna u otra manera nos ayudaron y acompañaron durante el desarrollo de este trabajo enseñándonos a valorar esta hermosa profesión.

Al caserío Las Marías y en particular a los poblados que entran en la zona de estudio: El Pozo y Los Filtros. Que nos permitieron la entrada a sus hogares para realizar estudios y trabajar en el terreno. De éste mismo modo, a la vocera de las UBCH Marly Porte quien proporcionó información clave para esta investigación.

Finalmente deseamos expresar un agradecimiento muy especial a nuestras familias quienes nos han apoyado a lo largo de nuestra vida académica y personal.

A todos los mencionados, nuestro más sincero agradecimiento.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
MATERIALES Y MÉTODOS	6
Diseño y tipo de investigación	6
Población y muestra	6
Consideraciones éticas	6
Procedimiento	8
Análisis de los datos	12
RESULTADOS	13
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	32
RECOMENDACIONES	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	39

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁG.
1	Número de individuos por especies de flebótomos colectados en las dos zonas de muestreo del caserío Las Marías, comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023.	13
2	Características clínicas y epidemiológicas de los habitantes de la comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023.	22
3	Medida de la concentración y pureza del ADN con los protocolos de extracción evaluados.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁG.
1	Ubicación geográfica del área de estudio en el caserío Las Marías de la comunidad Las Trincheras del municipio Naguanagua en el norte de Venezuela.	8
2	Micrografía en contraste de fases de la especie <i>Lu. gomezi</i> colectada en la zona de El Pozo, caserío Las Marías, comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023.	14
3	Micrografía en contraste de fases de la especie <i>Lu. olmeca bicolor</i> colectada en las dos zonas de muestreo del caserío Las Marías, comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023.	15
4	Micrografía en contraste de fases de la especie <i>Lu. ovallesi</i> colectada en las dos zonas de muestreo del caserío Las Marías, comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023.	16
5	Micrografía en contraste de fases de la especie <i>Lu. panamensis</i> colectada en las dos zonas de muestreo del caserío Las Marías, comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023.	17
6	Mapa georreferenciado de los sitios de colecta de la comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023.	19
7	Mapa de distribución espacial de las especies de <i>Lutzomyia</i> en los sitios de colecta de la comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023	20
8	Mapa de calor de zonas de riesgo de infección y distribución espacial de pacientes con lesiones, en los sitios de colecta de la comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023.	21
9	Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación de ADN de <i>Leishmania</i> en los lotes de <i>Lutzomyia</i> , muestras 1 al 40, teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml).	26



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO PROFESIONAL
ASIGNATURA: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



**DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y PREVALENCIA DE *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae)
COLECTADOS EN LA COMUNIDAD LAS TRINCHERAS, MUNICIPIO NAGUANAGUA,
ESTADO CARABOBO, 2023**

Autores: Alffred González, Erika Pereira y Stefany Toledo

Tutores: MSc. Diana Graterol y Dra. Elizabeth Ferrer

Asesor metodológico: Dra. Yolima Fernández

Línea de investigación: Parásitos Protozoarios y Entomología

Financiamiento: Autofinanciado

Realizado en: Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP) e Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (Instituto BIOMED)

RESUMEN

Las *Lutzomyia* son vectores de diversas especies de parásitos del género *Leishmania*, responsables de transmitir diferentes formas clínicas de la leishmaniasis. La identificación y detección de especies naturalmente infectadas, es fundamental para el control y tratamiento adecuado de esta enfermedad. El objetivo fue determinar la distribución espacial y prevalencia de *Lutzomyia* spp. colectados en el peridomicilio de la comunidad Las Trincheras, municipio Naguanagua, estado Carabobo. Se trató de un estudio de tipo descriptivo-correlacional y diseño de campo, transversal. Se colocaron trampas de luz CDC (18 h a 6 h) en 18 sitios durante los meses de noviembre y diciembre de 2023. Las especies se identificaron bajo lupa estereoscópica empleando la clave de Young y Duncan y Galati. La extracción de ADN se realizó con resina Chelex[®] 100 seguido de amplificación mediante PCR múltiple de la región intergénica de miniexón empleando electroforesis en geles de agarosa al 2%. Se elaboró un análisis estadístico y geoespacial con la distribución y frecuencia de *Lutzomyia* en los sitios de muestreo y variables a nivel epidemiológico. En total se colectaron 155 ejemplares adultos, 133 (85,8%) hembras y 22 (14,2%) machos pertenecientes a cuatro especies: *Lu. ovallesi* (71,6%), *Lu. panamensis* (16,1%), *Lu. olmeca bicolor* (9,0%) y *Lu. gomezi* (3,2%). *Lu. olmeca bicolor* y *Lu. gomezi* constituyen, respectivamente, primeros registros para el estado Carabobo. Aunque no se encontró infección natural en estas especies, la persistente aparición de casos y la presencia constante de flebótomos resaltan la necesidad de ampliar los estudios sobre la transmisión endémica en la zona.

Palabras clave: Sistemas de Información Geográfica; *Lutzomyia*; Leishmaniasis; (fuente: DeCS, BIREME)



UNIVERSITY OF CARABOBO
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
SCHOOL OF BIOANALYSIS
DEPARTMENT OF RESEARCH AND
PROFESSIONAL DEVELOPMENT
SUBJECT: RESEARCH WORK



**SPATIAL DISTRIBUTION AND PREVALENCE OF *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae)
COLLECTED IN THE LAS TRINCHERAS COMMUNITY, NAGUANAGUA
MUNICIPALITY, CARABOBO STATE, 2023**

Authors: Alfredo González, Erika Pereira and Stefany Toledo

Tutors: MSc. Diana Graterol and PhD. Elizabeth Ferrer

Methodological assessor: PhD. Yolima Fernández

Research line: Protozoan Parasites and Entomology

Funding: Autofinanced

Carried out in: Institute of Molecular Biology of Parasites (IBioMolP) and Institute for Biomedical Research “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (BIOMED)

ABSTRACT

Lutzomyia species are vectors of various parasites of the genus *Leishmania*, responsible for transmitting different clinical forms of leishmaniasis. The identification and detection of naturally infected species are essential for proper disease control and treatment. The objective of this study was to determine the spatial distribution and prevalence of *Lutzomyia* spp. collected in the peridomicile from Las Trincheras community, Naguanagua municipality, Carabobo state. It was a descriptive-correlational study with a cross-sectional field design. CDC light traps were placed at 18 sites from November to December 2023. Species were identified using stereoscopic lupe and the keys provided by Young and Duncan and Galati. DNA extraction was performed using Chelex[®]100 resin, followed by multiple PCR amplification of the miniexon intergenic region with agarose gel electrophoresis. A statistical and geospatial analyses were conducted to assess *Lutzomyia* distribution and frequency at the sampling sites, considering epidemiological variables. A total of 155 adult specimens were collected, including 133 (85.8%) females and 22 (14.2%) males, representing four species: *Lu. ovallesi* (71.6%), *Lu. panamensis* (16.1%), *Lu. olmeca bicolor* (9.0%), and *Lu. gomezi* (3.2%). *Lu. olmeca bicolor* and *Lu. gomezi* constitute first records for Carabobo state. Although no natural infection was found in these species, the persistent occurrence of cases and the constant presence of sandflies highlight the need to expand studies on endemic transmission in the area.

Key Words: Geographic Information Systems; *Lutzomyia*; Leishmaniasis (source: MeSH, NLM)

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una infección parasitaria tropical antropozoonótica que se caracteriza por comprometer la piel, mucosas y vísceras según la especie de *Leishmania* involucrada, además del medio ambiente y la respuesta inmune del paciente ⁽¹⁾. Esta enfermedad se encuentra entre las diez enfermedades tropicales desatendidas con más de 12 millones de personas infectadas, con 0,9 a 1,6 millones de nuevos casos al año, entre 20.000 y 30.000 defunciones y 350 millones de personas a riesgo de infectarse, según cifras de la OPS a nivel mundial ⁽²⁾.

Es considerada una enfermedad endémica ya que está presente en 88 países alrededor de los 5 continentes del mundo, siendo un problema de salud pública, debido a que está asociada a la malnutrición, los desplazamientos de población, las malas condiciones de vivienda, la debilidad del sistema inmunitario y la falta de recursos ^(1,3). En las Américas, actualmente se registra un promedio de 55.000 casos de leishmaniasis cutánea (LC) y leishmaniasis mucocutánea (LM), y 3.500 casos de leishmaniasis visceral (LV) al año, con una letalidad media de 7% ⁽²⁾.

En Venezuela, la enfermedad es endémica, registrándose casos en 292 municipios, con predominio en los valles del sistema montañoso de la costa, la depresión de Yaracuy, algunas regiones de los llanos, el sur del Orinoco, la zona montañosa y boscosa de Táchira, Mérida, Trujillo, Lara, Miranda y Sucre, además de los estados Carabobo y Aragua ⁽⁴⁾, con un reporte de 1.808 casos para el año 2021 y una tasa de incidencia promedio anual de 8,8 por 100.000 habitantes ⁽⁵⁾.

La enfermedad se transmite al ser humano principalmente por vía vectorial, a través de la picadura de flebótomos hembra hematófagos del orden Díptera, familia Psychodidae, género *Lutzomyia* ⁽⁶⁾. Estos insectos se caracterizan por ser

holometábolos con un ciclo de vida de alrededor de 30-45 días. Aunado a esto, poseen dimorfismo sexual, tres pares de patas largas con un cuerpo densamente peludo, tórax jorobado, antenas largas con 16 segmentos; alas lanceoladas y, en reposo, se disponen a 45° o en V y generalmente son de color marrón ⁽⁷⁾. Presentan estructuras diagnósticas útiles en la identificación de especies, como las espermatecas, la dentadura, el cibario de la hembra, la genitalia externa y la bomba genital del macho, palpómeros y venas alares ⁽⁵⁾.

En Venezuela se han descrito 100 especies de *Lutzomyia*, de las cuales unas 30 son antropofílicas. *Lu. longipalpis*, *Lu. pseudolongipalpis* y *Lu. evansi* son reconocidas como vectores de LV; mientras que *Lu. ovallesi*, *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis*, *Lu. spinicrassa*, *Lu. migonei*, *Lu. youngi*, *Lu. flaviscutellata*, *Lu. anduzei*, *Lu. umbratilis*, *Lu. olmeca reducta*, *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. trinidadensis* y *Lu. rangeliana* como vectores de LC y LM ⁽⁷⁾.

Aunque las *Lutzomyia* son consideradas vectores de leishmaniasis, para relacionar a un insecto con la transmisión de esta enfermedad, deben cumplirse varios criterios. Primero, debe demostrarse que el insecto se alimenta o tiene algún tipo de contacto con el hospedador. Además, debe haber una asociación biológica en tiempo y espacio entre el insecto, el patógeno y el reservorio. También es necesario confirmar repetidamente que el insecto es portador del patógeno y tiene la capacidad de transmitirlo a otro hospedador. Por último, se ha observado que existe una relación directamente proporcional entre la población del insecto sospechoso y la incidencia de las infecciones ⁽⁸⁾.

Además de lo anterior, existen factores epidemiológicos involucrados en la transmisión de leishmaniasis, entre los que destaca el aumento de la densidad poblacional y éxodo del área rural a las grandes ciudades, el calentamiento global, la deforestación, dispersión por transporte de animales domésticos reservorios, así

como por aumento de las áreas de explotación agrícola o industrial, la carencia de medidas de higiene y cercanía de las viviendas a zonas silvestres de intensa transmisión del parásito ^(7,8). Todas estas situaciones contribuyen a la adaptación y rápida dispersión de especies de vectores lo que favorece el contacto hombre-vector, condicionando la dinámica de transmisión y distribución de las especies de *Leishmania* y colocando al vector como un elemento potencial para comprender el proceso eco-epidemiológico de la enfermedad ⁽⁹⁾.

Diversos estudios destacan la importancia de comprender la dinámica de los vectores y su relación con la propagación de la leishmaniasis. Capucci *et al.* (2023) utilizaron trampas de luz para capturar flebótomos y detectaron ADN de *Leishmania* en siete hembras en cuatro ecotopos diferentes. Esto evidencia que todos los ecotopos en la zona tienen un perfil epidemiológico adecuado para la transmisión y expansión de la enfermedad ⁽¹⁰⁾. Además, otros estudios como el de Rujano *et al.* (2021), en Mérida, Venezuela, han demostrado que los flebotominos tienen una amplia distribución espacial en diferentes ecorregiones, incluyendo zonas urbanas y de gran impacto poblacional ⁽¹¹⁾. Mientras que el estudio realizado por Alemán-Santos *et al.* (2021) en Colombia demostró que la presencia de *Lu. evansi* con ingestas de sangre mixtas de humanos y caninos evidencia el vínculo epidemiológico entre los vectores (*Lutzomyia*), los posibles reservorios y la población humana ⁽¹²⁾.

La identificación precisa de las especies de *Leishmania* en los flebótomos es crucial para abordar eficazmente la leishmaniasis desde una perspectiva de salud pública, ya que contribuye al entendimiento de la epidemiología y distribución geográfica de la enfermedad, permitiendo orientar el muestreo hacia áreas poco estudiadas y establecer estrategias para definir zonas de riesgo y áreas prioritarias de control. Además, ayuda a detectar cepas resistentes a los tratamientos, lo que facilita la elección del enfoque más adecuado. En última instancia, esta caracterización de las

poblaciones de parásitos circulantes mejora el monitoreo epidemiológico y el manejo de los vectores involucrados ⁽¹³⁾.

En el estado Carabobo, son pocos los estudios que aportan cifras de casos de leishmaniasis en las comunidades, lo que trae como consecuencia el descuido en la vigilancia epidemiológica. Para el año 2021, un brote de leishmaniasis ⁽¹⁴⁾ activó las alertas en los habitantes del caserío Las Marías, ubicado en las coordenadas 10°16'51" de latitud norte y 68°6'19" de longitud oeste, de la comunidad Las Trincheras del municipio Naguanagua del estado Carabobo al norte del país ⁽¹⁵⁾. Dicha comunidad se caracteriza por ubicarse en una zona montañosa con densa vegetación donde su actividad principal es la siembra, además de tener condiciones ambientales y climáticas, temperatura, humedad y vientos favorables a la persistencia de una entomofauna capaz de mantener el ciclo de la enfermedad, siendo las condiciones sociosanitarias y socioeconómicas, la extrema pobreza, las condiciones inadecuadas de las viviendas, la mala alimentación y educación, los factores que favorecen esta parasitosis que afecta a aproximadamente 348 personas según censo local.

En esta comunidad, se presume que existen diversas formas clínicas de la enfermedad, sin embargo, no se tiene conocimiento sobre las especies de *Lutzomyia* implicadas en la transmisión de la infección, información útil a nivel epidemiológico para detectar los posibles focos de infección. A nivel diagnóstico, tampoco se tienen reportes oficiales, es por esta razón que surge la necesidad de determinar la distribución espacial y prevalencia de *Lutzomyia* spp. colectados en el caserío Las Marías de la comunidad Las Trincheras del municipio Naguanagua estado Carabobo, con la finalidad de comprender la distribución y circulación de especies de *Leishmania* en los vectores que habitan en la zona, que permitan plantear estrategias más apropiadas para disminuir la probabilidad de transmisión a humanos y mejorar la vigilancia entomológica y control de leishmaniasis.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Determinar la distribución espacial y prevalencia de infección natural por *Leishmania* spp. en *Lutzomyia* spp. colectados en la comunidad Las Trincheras, municipio Naguanagua, estado Carabobo para el año 2023.

Objetivos específicos

- Identificar las especies de vectores de *Leishmania* spp. bajo lupa estereoscópica y clasificarlos taxonómicamente empleando la clave de Galati.
- Definir la disposición espacial de las especies de *Lutzomyia* colectados en la comunidad Las Trincheras, mediante el *software* utilitario *Google Earth*.
- Determinar la presencia de ADN de *Leishmania* spp. en *Lutzomyia* spp. colectados en la comunidad de estudio; empleando la PCR múltiple de la región intergénica de miniexón para tipificar los complejos *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) mexicana* y *L. (L.) donovani*.
- Asociar la prevalencia obtenida en las especies de *Lutzomyia* con los datos registrados de infección por *Leishmania* spp. en humanos, en la comunidad Las Trincheras, municipio Naguanagua, estado Carabobo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y tipo de investigación

La investigación fue de tipo no experimental descriptiva correlacional con un diseño de campo y de corte transversal, centrado en coleccionar los flebotomos de las áreas peridomiciliarias de la comunidad sin manipular variables intencionalmente y en un momento y tiempo único ⁽¹⁶⁾.

Población y muestra

La población estuvo conformada por todos los flebotomos adultos que habitan en el caserío Las Marías, comunidad Las Trincheras del municipio Naguanagua, estado Carabobo, Venezuela. La muestra estuvo constituida por 133 ejemplares hembras del género *Lutzomyia*, coleccionadas utilizando seis trampas de luz CDC ⁽¹⁷⁾, a una altura de 1,2-1,5 m, en el horario de 18:00 a 06:00 h, de dos a tres noches consecutivas durante los meses de noviembre a diciembre del 2023.

Los insectos coleccionados fueron retirados del coleccionador empleando un succionador bucal y colocados en bolsas plásticas identificadas con: zona, fecha, casa y número de trampa, los cuales se almacenaron en tubo con etanol al 90% para luego ser clasificados taxonómicamente por el personal del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (Instituto BIOMED).

Consideraciones éticas

Los objetivos de la investigación fueron comunicados en primer lugar a la vocera de las UBCH caserío Las Marías, quien aprobó inicialmente el desarrollo del

estudio en la comunidad. Posteriormente, la información fue extendida a los integrantes de cada grupo familiar de las viviendas seleccionadas con énfasis en el jefe de familia, quien autorizó la participación voluntaria en la investigación, a través de la firma de un consentimiento informado ⁽¹⁸⁾, en el cual se detallaron los procedimientos a desarrollar (Anexo A).

Todos los protocolos, formatos para la colecta de insectos (Anexo B, C y D) y el consentimiento informado fueron validados por el Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo, sede Aragua. Asimismo, la disposición de las trampas en las áreas peridomiciliarias no causó daño o perjuicio al ecosistema del lugar.

Área de estudio

El estudio se desarrolló en la zona rural del caserío Las Marías ubicado en la comunidad Las Trincheras, municipio Naguanagua del estado Carabobo. Abarca un área de aproximadamente 273,18 hectáreas con una población según la propia comuna de 348 habitantes para el año 2020. El área fue escogida por estar asociada a los casos humanos de leishmaniasis y se encuentra a unos 714 metros sobre el nivel del mar, en las coordenadas 10°16'51" de latitud norte y 68°6'19" de longitud oeste ⁽¹⁵⁾.

El área de estudio abarcó las zonas denominadas “El Pozo” y “Los Filtros”, seleccionando 18 viviendas donde al menos un miembro de la familia presentaba lesiones sugestivas de leishmaniasis como criterio de inclusión. Estas zonas corresponden a un ambiente selvático intervenido, con una media de temperatura máxima anual de 28,6°C, una precipitación promedio que varía entre 25 y 200 mm por año y una humedad relativa anual del 72 a 79%.

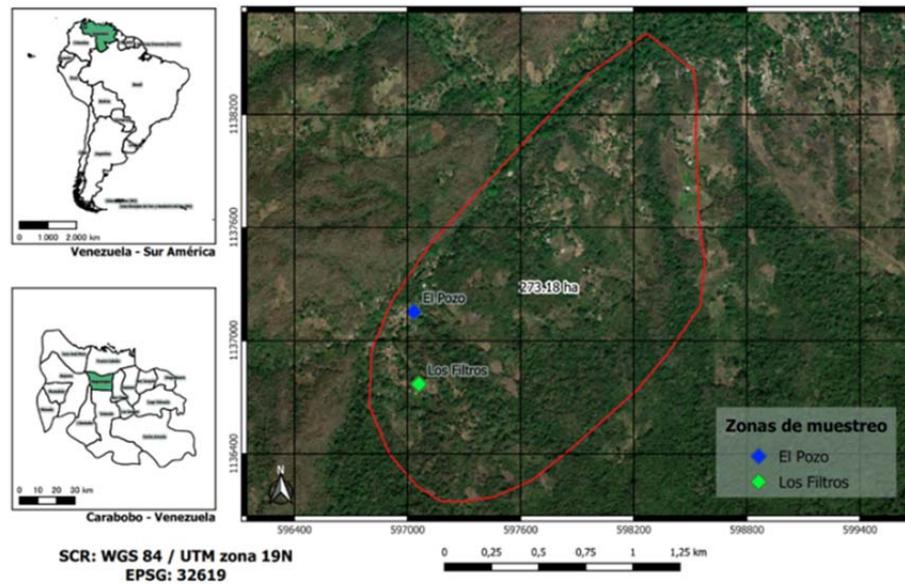


Figura 1. Ubicación geográfica del área de estudio en el caserío Las Marías de la comunidad Las Trincheras del municipio Naguanagua en el norte de Venezuela. Mapa creado utilizando el *software* QGIS

Procedimiento

Identificación taxonómica de especies de *Lutzomyia*

Después de coleccionar los insectos, se procedió a examinarlos con el objetivo de separar los flebótomos del género *Lutzomyia* de otros insectos. Para ello, se utilizó una lupa estereoscópica (Leica, MZ6). Posteriormente, se realizó la distinción entre hembras y machos del mismo género. Las hembras se sometieron a un proceso de clarificación con fenol y se cuantificaron manualmente mediante el uso de una pinza entomológica y un microscopio de contraste de fases (Zeiss, 47 60 12 9901).

Para la identificación a nivel de especie, se siguió la clave taxonómica descrita por Galati ⁽¹⁹⁾ y Young y Duncan ⁽²⁰⁾, basándose en la observación morfológica de cibarios, antenas, palpos y espermatecas.

Una vez identificadas, las muestras se conservaron en microtubos con etanol al 90%, agrupándolas en lotes de 5-10 ejemplares según la especie, la zona y número de trampa, hasta que se inició el protocolo de extracción de ADN.

Georreferenciación de los sitios de colecta

Los sitios de colecta en las viviendas seleccionadas fueron georreferenciados en coordenadas de proyección Universal Transversal de Mercator (UTM) utilizando el *software* utilitario *Google Earth* (<https://earth.google.com/web/>) generando posteriormente una capa vectorial de puntos con la base de datos de los ejemplares hembras de *Lutzomyia* según zona y número de trampa, en un archivo con extensión kml, el cual fue transformado en un archivo *shapefile* (extensión .shp) para el análisis espacial utilizando el *software* de código abierto QGIS 3.34.8 LTR (*Quantum GIS Development Team*, 2022) disponible en <https://qgis.org/>. Para la proyección se empleó el sistema de referencia de coordenadas UTM Huso 19 Norte datum WGS 84 (EPSG 32619).

Extracción de ADN a partir de *Lutzomyia*

Para la extracción de ADN del parásito, a partir de las hembras de *Lutzomyia* identificadas según especie, zona y número de trampa, se realizó una adaptación de los protocolos de Rivero *et al.* ⁽²¹⁾ y Reyes *et al.* ⁽²²⁾ mediante el empleo de homogeneizador de tejidos seguida de extracción con resina de Chelex[®]-100. Vale mencionar que previamente se probaron cuatro protocolos diferentes para llegar a este punto: a) sonicación con el disruptor de ultrasonido (Branson Sonifier, 150) aplicando cuatro pulsos de 15 seg (con una potencia de 7W) con intervalos de descanso de 2

min; b) homogeneización empleando homogeneizador de tejidos; c) maceración con mortero y mazo y d) lisis con enzimas proteolíticas (proteínasa K).

Lotes de máximo 7 ejemplares de *Lutzomyia* almacenados en etanol al 90% fueron centrifugados (Labnet Hermle, Z 233 M-2) durante 3 min a 14000 rpm para luego descartar sobrenadante y realizar 3 lavados con tampón salino fosfato (PBS) 0,15 M pH 7,2 (Na_2HPO_4 57 mM; KH_2PO_4 18 mM; NaCl 76,9 mM) y centrifugados en las mismas condiciones. Posteriormente, a cada tubo de 1,5 mL sobre hielo, se le agregó 500 μL de tampón de lisis (Tris 50 mM pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 100 mM, SDS al 1%) por cada lote de insecto y se transfirió a un homogeneizador de vidrio con pistón de teflón (Thomas Scientific) realizando 10 homogeneizaciones de la muestra, finalizado el proceso se traspasó el homogenato a un tubo de 1,5 mL para centrifugar a 14000 rpm durante 3 min, se retiró sobrenadante dejando un volumen de 50 μL , al cual se le adicionó 200 μL de la resina de Chelex[®]-100 al 5% y se incubó durante 30 min a 56°C (Lab-Line, 18050A). Luego, se agitó en vórtex (Barnstead, M63215) por 10 seg y se incubó a 100°C durante 10 min (Heater LabLine, 2054); para agitarse nuevamente por 10 seg. La resina y las proteínas desnaturalizadas se separaron mediante centrifugación por 3 min a 14000 rpm y el sobrenadante obtenido que contiene el ADN, se transfirió a un tubo estéril previamente rotulado para ser almacenado a -20°C hasta su uso.

Medida de la concentración y pureza del ADN

La concentración y pureza del ADN extraído de los lotes de *Lutzomyia* se determinó por los métodos descritos por Sambrook y Russell⁽²³⁾. La concentración de ADN fue estimada en un espectrofotómetro UV/Visible (Fisher Scientific, Genesys 10UV), midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) y utilizando la siguiente fórmula: $[\text{ADN}] = A_{260} \text{ nm} \times \text{factor de dilución} \times 50 \mu\text{g/mL}$. El grado de pureza se calculó por

el índice de absorbancia 260/280 nm, considerándose como valores óptimos de pureza el rango entre 1,7- 1,9⁽²⁴⁾.

Determinación de los complejos de *Leishmania* mediante PCR múltiple de la región intergénica de miniexón

Se siguió el protocolo descrito por Harris *et al.*⁽²⁵⁾, empleando a LU-5A (5'-TTT ATT GGT ATG CGA AAC TTC-3') como cebador directo, cuya secuencia de oligonucleótidos es conservada en todas las especies de *Leishmania* y varios cebadores reversos: LB-3C (5'-CGT (C/G)CC GAA CCC CGT GTC-3'), LM-3A (5'-GCA CCG CAC CGG (A/G)CC AC-3') y LC-3L (5'-GCC CGC G(C/T)G TCA CCA CCA T-3'), todos complementarios a las secuencias variables. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 15 µL, con tampón (Tris-HCl 50 mM, pH 9; NaCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP) 0,1 mM, cebador directo LU-5A 0,3 µM y los cebadores reversos (LB-3C, LM-3A, LC-3L) 0,3 µM, ADN polimerasa 0,5 U y ADN molde 10 ng. Para el control de calidad de la PCR, se incluyó un control negativo correspondiente a la mezcla de reactivos libre de ADN y controles positivos correspondientes a ADN de las cepas de *Leishmania* en cultivo [*L. (V). braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903⁽²⁶⁾, *L. (L). mexicana* MHOM/BZ/1982/BEL21⁽²⁷⁾ y *L. (L). donovani* MHOM/IN1980/DD8⁽²⁸⁾].

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador automático (Biosystems, Veriti 96-Well Thermal Cycler) utilizando el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial 95°C x 5 min, seguido de 35 ciclos (desnaturalización 95°C x 30 seg, hibridación 54°C x 45 seg, extensión 72°C x 30 seg) y una extensión final 72°C x 5 min. Los productos de amplificación fueron visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. La separación del ADN se realizó en una cámara de electroforesis horizontal (Labnet, Gel XL Ultra V-2), con voltaje constante 100 V, utilizando TAE (Tampón Tris Ácido

acético 40 mM, EDTA 0,5 M; pH 8,0) como tampón de migración. Las bandas de ADN obtenidas se visualizaron en un equipo de fotodocumentación DigiDoc-It de UVP.

Análisis de los datos

Los resultados obtenidos se analizaron en tablas descriptivas empleando frecuencias absolutas y relativas (%). En el caso de la PCR, las bandas de ADN se visualizaron con luz ultravioleta usando el sistema DigiDoc-It de UVP. El tamaño de las bandas de ADN se estimó por comparación con los marcadores de ADN 100 pb.

Se utilizó el paquete estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) versión 26.0 para *Windows* y el *software* QGIS versión 3.34.8-Prizren para la elaboración de los mapas donde se analizó las variables en formato ráster que se relacionó con la distribución y frecuencia de *Lutzomyia* en los sitios de colecta del área de estudio. Se aplicó la prueba Chi cuadrado de Pearson (χ^2) con un nivel de confiabilidad del 95% ($p < 0.05$) para detectar las asociaciones estadísticamente significativas entre las variables a nivel epidemiológico.

RESULTADOS

Identificación taxonómica de especies de vectores de *Leishmania* spp.

Se colectaron 155 (133 ♀ y 22 ♂) ejemplares adultos de los géneros *Lutzomyia* en 18 sitios de muestreo correspondientes a la zona de El Pozo con 41,9% (n=65) y Los Filtros con 58,1% (n=90). Las especies encontradas en orden de frecuencia fueron: *Lu. ovallesi* con 71,6% (n=111), *Lu. panamensis* con 16,1% (n=25), *Lu. olmeca bicolor* 9,0% (n=14) y *Lu. gomezi* con 3,2% (n=5). El número total de ejemplares colectados por zona de muestreo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Número de individuos por especies de flebótomos colectados en las dos zonas de muestreo del caserío Las Marías, comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023.

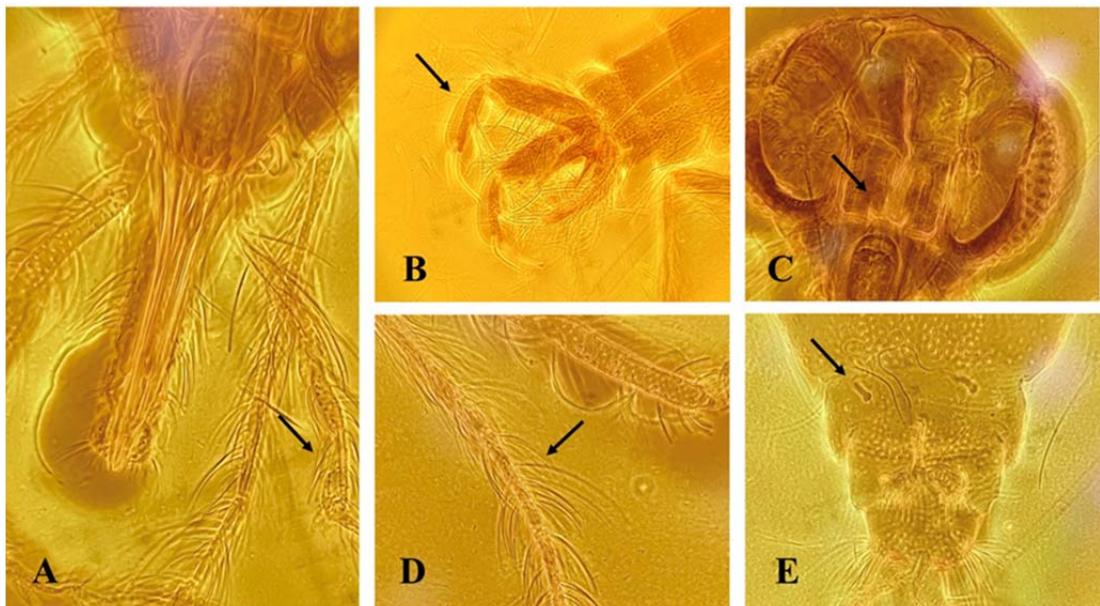
ESPECIES	ZONAS DE MUESTREO					
	El Pozo		Los Filtros		Total	
	♀	♂	♀	♂	n	%
<i>Lutzomyia gomezi</i>	4 (2,6)	1 (0,6)	-	-	5	3,2
<i>Lutzomyia olmeca bicolor</i>	12 (7,7)	-	1 (0,6)	1 (0,6)	14	9,0
<i>Lutzomyia ovallesi</i>	35 (22,6)	3 (1,9)	65 (41,9)	8 (5,2)	111	71,6
<i>Lutzomyia panamensis</i>	10 (6,5)	-	6 (3,9)	9 (5,8)	25	16,1
Total	61 (39,4)	4 (2,6)	72 (46,5)	18 (11,6)	155	100

Con respecto a la abundancia de los ejemplares hembras obtenidos, *Lu. ovallesi* fue predominante en ocho viviendas de la zona de Los Filtros, representando el 41,9% (n=65), mientras que en El Pozo el 22,6% (n=35) de las hembras se encontró en seis viviendas. En contraste, *Lu. panamensis* predominó en cinco viviendas de la zona de El Pozo, con un 6,5% (n=10), mientras que en Los Filtros el 3,9% (n=6) se localizó en tres viviendas. Tanto *Lu. olmeca bicolor* como *Lu. gomezi* predominaron en cuatro viviendas de El Pozo, con un 7,7% (n=12) y 2,6% (n=4), respectivamente. Estos

hallazgos son significativos, ya que representan los primeros registros de estas dos últimas especies (*Lu. olmeca bicolor* y *Lu. gomezi*) para el estado Carabobo, particularmente en la zona de estudio.

La identificación de las especies de flebotomíneos se realizó básicamente mediante la observación de características morfológicas externas e internas, utilizando un microscopio de contraste de fases marca Zeiss. Se examinaron estructuras como cabeza, tórax, abdomen y apéndices para la identificación de cibarios, antenas, palpos y espermatecas. La terminología utilizada para describir las estructuras morfológicas y la ubicación de las diversas especies de flebótomos se basó en los criterios establecidos por Galati ⁽¹⁹⁾ y Young y Duncan ⁽²⁰⁾.

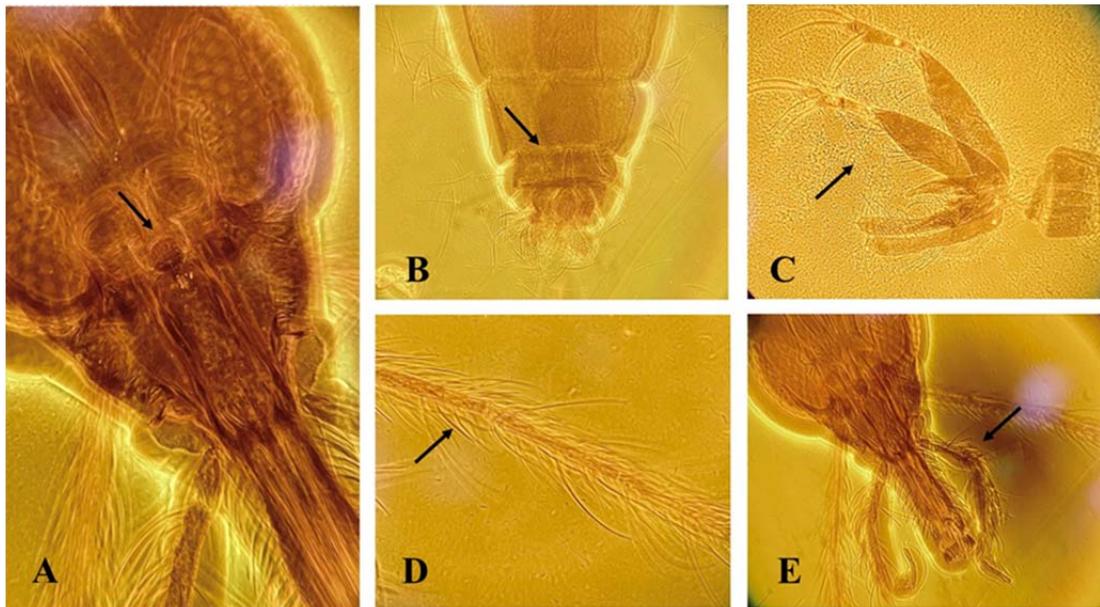
A continuación, se describen las características diferenciales entre especies del



género *Lutzomyia* colectadas en el área de estudio.

Figura 2: Micrografía en contraste de fases de la especie *Lu. gomezi* colectada en la zona de El Pozo, caserío Las Marías, comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023. Se muestran estructuras de: Hembra **A**= Flagelómero. Macho **B**= Genitalia. Hembra **C**= Cibario; **D**= Palpo y **E**= Espermateca.

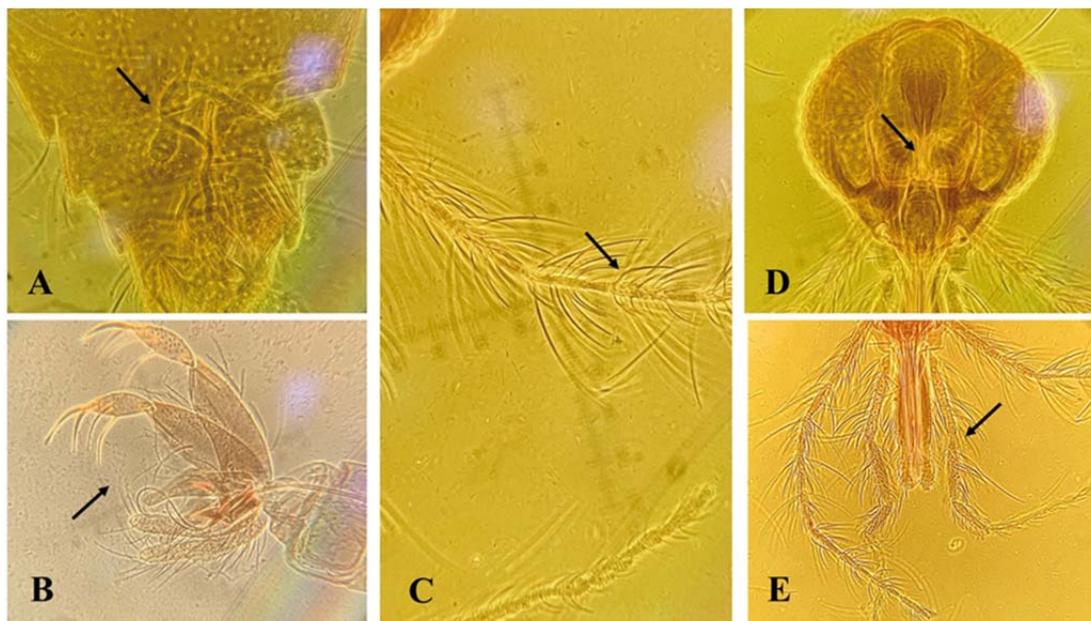
Lu. gomezi fue descrita por primera vez en Venezuela por Nitzulescu en 1931. Esta corresponde a una de las 74 especies de flebótomos presentes en Panamá, mencionadas por Christensen *et al.*, (1983) y forma parte de casi 300 especies reportadas en el Continente Americano ⁽²⁹⁾. La hembra presenta una pigmentación parcial en la cabeza, fórmula palpal 1, 4, 2, 3 y 5. La antena con flagelómero terminal (XIV) más corto que el anterior (XIII) (Figura 2-A); el cibario posee una fila de cuatro dientes horizontales, acompañado de dientes verticales en dos filas irregulares y arco cibarial completo sin pigmento (Figura 2-C). El cuerpo de la espermateca es subsférico, con una anulación subterminal ancha y ductos individuales largos y delgados ⁽³⁰⁾. Por consiguiente, el macho posee una genitalia con cuatro espinas en posición 2.2, gonocoxito con tubo basal formado por 12 o más setas implantadas en



una protuberancia circular en forma de racimos de mora (Figura 2-B).

Figura 3: Micrografía en contraste de fases de la especie *Lu. olmeca bicolor* colectada en las dos zonas de muestreo del caserío Las Marías, comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023. Se muestran estructuras de: Hembra **A**= Cibario; **B**= Espermateca. Macho **C**= Genitalia. Hembra **D**= Flagelómero y **E**= Palpo.

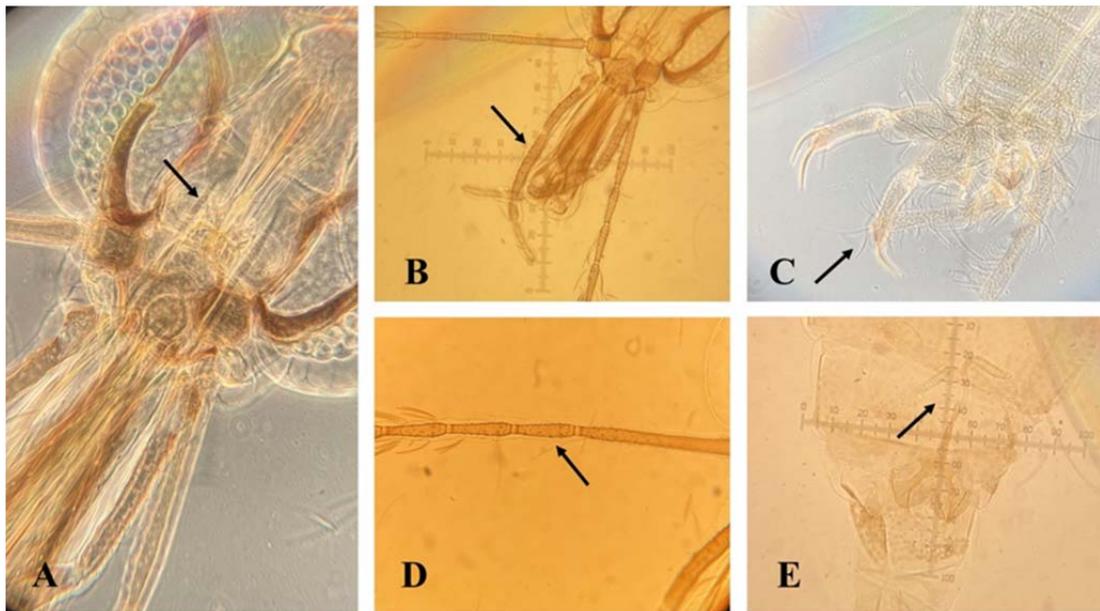
Lu. olmeca bicolor es una especie de flebótomo antropofílico, implicada en la transmisión de *Leishmania*. Se caracteriza por tener una cabeza delgada y pigmentada, con labroepifaringe alcanzando el ápice del flagelómero III y el tercio distal del tercer palpómero (Figura 3-A y 3-D). En el tórax, destaca la presencia de un escudo pigmentado que contrasta con un escutelo claro. Las hembras presentan características distintivas como una hilera de ocho dientes cibariales horizontales (Figura 3-A) y espermatecas divididas en aproximadamente 12 anillos, con botón terminal alargado (Figura 3-B). Estos rasgos morfológicos permiten diferenciar *Lu.*



olmeca bicolor de otras especies de flebótomos ⁽³¹⁾.

Figura 4: Micrografía en contraste de fases de la especie *Lu. ovallesi* colectada en las dos zonas de muestreo del caserío Las Marías, comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023. Se muestran estructuras de: Hembra **A**= Espermateca. Macho **B**= Genitalia. Hembra **C**= Flagelómero; **D**= Cibario y **E**= Palpo.

Lu. ovallesi es una especie de flebótomo presente en América Central y del Sur, reconocida por ser un vector de LC. Morfológicamente, se distingue por su cabeza delgada y pigmentada con estructuras sensoriales bien desarrolladas, antenas con un flagelómero terminal más corto que el anterior (Figura 4-C), un cibario con ocho dientes horizontales para triturar y deglutir glóbulos rojos (Figura 4-D), un tórax con



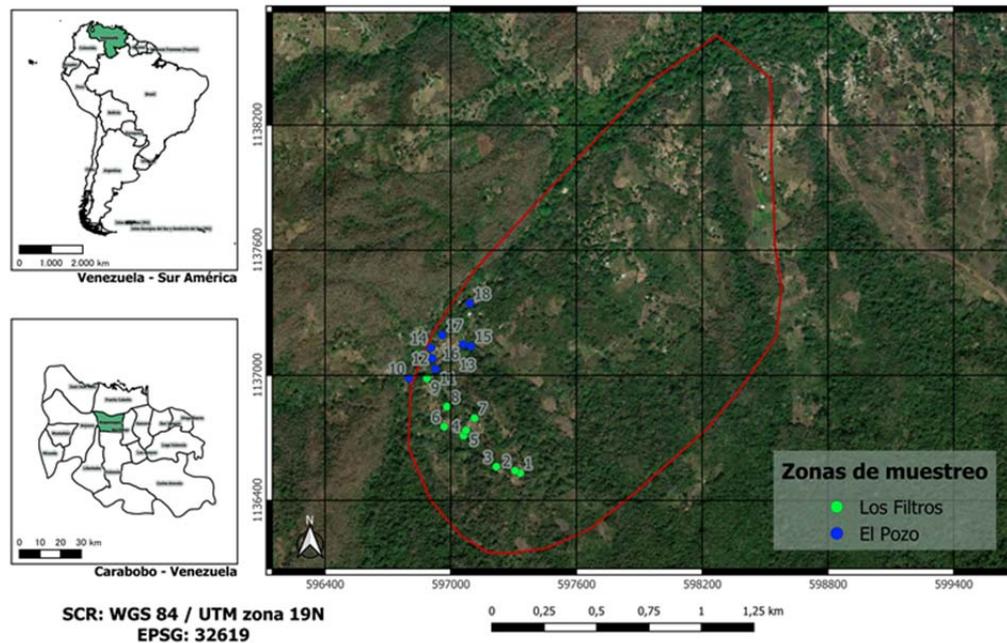
un escudo pigmentado que contrasta con un escutelo claro, y espermatecas divididas en aproximadamente 12 anillos con un botón terminal alargado (Figura 4-A). Además, posee un tercer palpómero notablemente largo, vital para la detección de señales químicas en su entorno ⁽³²⁾.

Figura 5: Micrografía en contraste de fases de la especie *Lu. panamensis* colectada en las dos zonas de muestreo del caserío Las Marías, comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023. Se muestran estructuras de: Hembra **A**= Cibario; **B**= Palpo. Macho **C**= Genitalia. Hembra **D**= Flagelómero y **E**= Espermateca.

Lu. panamensis fue descrita a partir de especímenes machos colectados en la zona del canal de Panamá. En general se caracterizan porque el cuerpo no está pigmentado. En las hembras, la fórmula palpal es 1, 4, 5, 2 y 3, con el palpómero 5 más corto que la mitad de la longitud del palpómero 3 (Figura 5-B). La estructura del cibario presenta cuatro dientes horizontales y una fila transversal de dientes verticales, con un área pigmentada triangular conspicua y un arco cibarial completo (Figura 5-A). La espermateca es quitinizada e imbricada con 13 anillos, con una anulación terminal en posición asimétrica. Los ductos individuales son más cortos que el cuerpo de la espermateca, mientras que el ducto común es rugoso en la parte superior y liso en la basal (Figura 5-E). La genitalia del macho incluye un gonoestilo con 4 espinas en posición basal, espinas apicales bien desarrolladas y una espina interna atrofiada (Figura 5-C) ⁽³⁰⁾.

En resumen, las figuras anteriores muestran una similitud en las estructuras de la cabeza de la hembra para las cuatro especies encontradas. No obstante, en el área del cibario (Figura 2-C; Figura 3-A; Figura 4-D y Figura 5-A), se resaltan diferencias entre las especies debido a la característica dentada de quitina, utilizada por la hembra para triturar y deglutir los glóbulos rojos durante la alimentación, cuyo tamaño y forma varía entre especies. Del mismo modo, el palpo se distingue por el tamaño y los segmentos (Figura 2-D; Figura 3-E; Figura 4-E y Figura 5-B), mientras que el flagelómero se caracteriza por su tamaño, siendo una estructura única e importante para los flebótomos, ya que mide la intensidad y dirección del viento (Figura 2-A; Figura 3-D; Figura 4-C y Figura 5-D). La espermateca (Figura 2-E; Figura 3-B; Figura 4-A y Figura 5-E) y la genitalia (Figura 2-B; Figura 3-C; Figura 4-B y Figura 5-C), son las estructuras ideales para la identificación taxonómica de los flebótomos del género *Lutzomyia*, gracias a su visualización bien definida y única para cada especie.

Disposición espacial de las especies de *Lutzomyia* colectados



La ubicación georreferenciada de las viviendas de los grupos familiares participantes en cada zona visitada de la comunidad Las Trincheras se muestra en la Figura 6. Se seleccionaron 18 viviendas como sitios de colecta, de las cuales nueve están en la zona de Los Filtros y nueve en la zona de El Pozo. Las viviendas que formaron parte del estudio, se escogieron considerando que algún miembro de la familia presentara lesiones activas o curadas sugestivas de leishmaniasis.

Figura 6. Mapa georreferenciado de los sitios de colecta de la comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023. Mapa creado utilizando el *software* QGIS.

La Figura 7 muestra la distribución geoespacial agregada de las especies de *Lutzomyia* en la comunidad Las Trincheras, detallando la cantidad de ejemplares hembras capturadas por sitio de colecta. En el **mapa A**, se observa la distribución de *Lu. gomezi*, predominando en cuatro sitios de colecta de la zona de El Pozo, con un ejemplar capturado en cada uno ($n=4/133$). El **mapa B** muestra la distribución de *Lu. olmeca bicolor* en cuatro sitios de colecta de El Pozo y uno en Los Filtros, con 1, 2, 3 y hasta 5 ejemplares capturados ($13/133$). El **mapa C**, muestra la distribución de *Lu. ovallesi*, especie más frecuentemente encontrada, en 14 sitios de colecta, predominando en Los Filtros ($8/14$) con hasta 65 ejemplares capturados, mientras que en El Pozo ($6/14$) se capturaron 35 ejemplares, la mayoría de ellos en el sitio de colecta número 10, situado cerca de los cauces del río. Finalmente, el **mapa D** muestra la distribución de *Lu. panamensis*, segunda especie más frecuente, encontrada en ocho sitios de colecta que predominan en El Pozo ($5/8$) con 10 ejemplares capturados, entre tanto que en Los Filtros ($3/8$) se capturaron hasta 6 ejemplares.

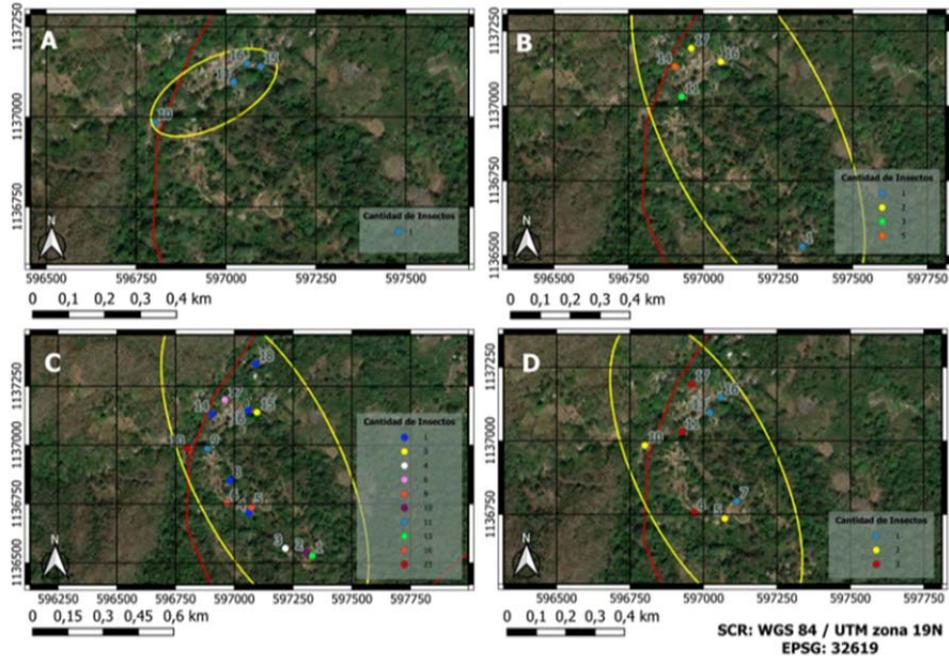


Figura 7. Mapa de distribución espacial

cial de las especies de *Lutzomyia* en los sitios de colecta de la comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023. **A**= disposición espacial de *Lu. gomezi* según el sitio de colecta y cantidad de insectos capturados; **B**= disposición espacial de *Lu. olmeca bicolor* según el sitio de colecta y cantidad de insectos capturados; **C**= disposición espacial de *Lu. ovallesi* según el sitio de colecta y cantidad de insectos capturados y **D**= disposición espacial de *Lu. panamensis* según el sitio de colecta y cantidad de insectos capturados. Mapa creado con el *software* QGIS.

La Figura 8 ilustra las zonas de riesgo de infección por *Lutzomyia*, mediante un mapa de calor, mostrando la distribución espacial de pacientes con lesiones en los sitios de colecta. En el **mapa A**, se observan cinco zonas de riesgo (muy bajo a muy alto), destacando que en la zona de muy alto riesgo con mayor proporción de *Lu. gomezi*, la distribución de pacientes con lesiones varía de uno a tres individuos, ubicándose en la zona de El Pozo. El **mapa B** muestra hasta seis pacientes con lesiones en las zonas de riesgo, con la especie *Lu. olmeca bicolor*, que predomina en El Pozo, con un caso en Los Filtros. El **mapa C** muestra hasta seis pacientes con

lesiones, con una disposición espacial agregada de *Lu. ovallesi*, de mayor frecuencia tanto en El Pozo como en Los Filtros. El **mapa D** revela hasta nueve pacientes con lesiones, con igual disposición espacial agregada de *Lu. panamensis*, segunda en frecuencia tanto en El Pozo como en Los Filtros. El uso del *software* QGIS proporciona una visualización clara de la distribución de especies de *Lutzomyia* y áreas de riesgo de infección, facilitando la identificación y manejo de focos endémicos.

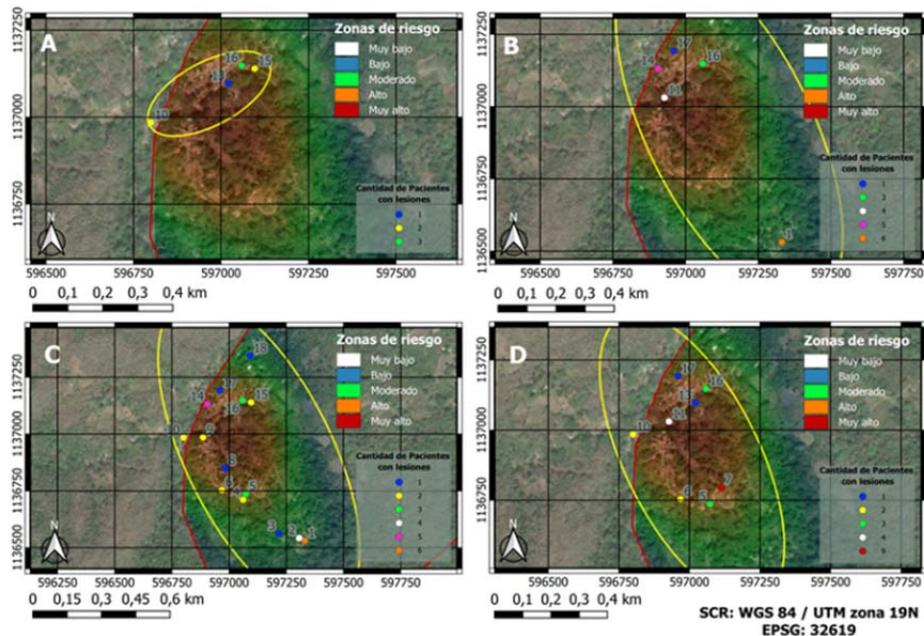


Figura 8. Mapa de calor de zonas de riesgo de infección y distribución espacial de pacientes con lesiones en los sitios de colecta de la comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023. **A**= disposición espacial de pacientes con lesiones en la zona de captura de *Lu. gomezi*; **B**= disposición espacial de pacientes con lesiones en la zona de captura de *Lu. olmeca bicolor*; **C**= disposición espacial de pacientes con lesiones en la zona de captura de *Lu. ovallesi* y **D**= disposición espacial de pacientes con lesiones en la zona de captura de *Lu. panamensis*. Mapa creado con el *software* QGIS.

La Tabla 2 presenta las características clínico-epidemiológicas de los habitantes de Las Trincheras, obtenidas mediante una encuesta domiciliaria aplicada a los jefes de familia en 18 sitios de colecta.

Tabla 2. Características clínicas y epidemiológicas de los habitantes de la comunidad Las Trincheras, estado Carabobo, año 2023.

CARACTERÍSTICAS		ZONAS DE MUESTREO		(n= 18)		p valor*
		El Pozo	Los Filtros	n	%	
EPIDEMIOLOGÍCAS (Condición de la Vivienda)						
Paredes	Bloques/Ladrillos sin frisar	3	3	6	33,3	0,129
	Bloques/Ladrillo frisado	6	3	9	50,0	
	Adobe/Bahareque frisado	-	3	3	16,6	
Techos	Platabanda	1	-	1	5,6	0,464
	Machihembrado	3	4	7	38,8	
	Zinc/Acerolit	4	5	9	50,0	
	Asbesto	1	-	1	5,6	
Pisos	Cerámica/Granito	2	-	2	11,1	0,134
	Cemento	7	7	14	77,7	
	Tierra	-	2	2	11,1	
Vegetación y el área de los alrededores de la vivienda						
	Bosque húmedo a < 10 m. de la vivienda	9	9	18	100,0	0,090
	Arbusto y césped rodeando la vivienda < 10 m	9	9	18	100,0	
	Matas de café o cacao < 10 m	9	7	16	88,8	
	Matas de café o cacao > de 10 m	-	2	2	11,1	
	Sitios para almacenar cosechas dentro de los 10 m	3	6	9	50,0	
	Basura a > de 10 m. de la vivienda	6	9	15	83,3	
	Basura dentro de los 10 m de la vivienda	3	-	3	16,6	
Anexos en el peridomicilio	Gallinero	8	5	13	72,2	0,271
	Cochinera	1	-	1	5,5	
	Depósito de leña	6	7	13	72,2	
Disposición de excretas						
	Baño con poceta conectada a pozo séptico	9	8	17	94,4	0,330
	Excusado de hoyo o letrina	-	1	1	5,5	
Recolección de basura y desecho						
	Recolección municipal	6	-	6	33,3	0,004
	Quemada	-	3	3	16,6	
	Se arroja en cualquier lugar	3	6	9	50,0	
Reservorios parasitarios						
	Convive con animales (caninos)	7	5	12	66,6	0,405
CLÍNICAS (Pacientes con lesiones)						
Tipo de lesión	Lesiones activas	-	3	3	16,6	0,479
	Lesiones curadas	9	9	18	100,0	
Tratamiento	Sanidad	7	8	15	83,3	0,466
	Casero	2	1	3	16,6	

*valor de la significancia para la prueba χ^2 de Pearson ($p < 0.05$)

Se observó que la mayoría de las viviendas seleccionadas en este estudio se caracterizan por tener paredes de bloques/ladrillo frisado (50,0%), especialmente en la zona de El Pozo, y bloques/ladrillo sin frisar (33,3%) en la zona de Los Filtros. Los techos predominantes son de zinc/acerolit (50,0) en Los Filtros, seguidos por techos de machihembrado (38,8%). En cuanto a los pisos, el 77,7% de las casas tiene pisos de cemento, con un menor porcentaje de pisos de tierra (16,7%), estos últimos ubicados en Los Filtros.

Todas las viviendas en el estudio (100%, n=18) están rodeadas de bosque húmedo, arbustos y césped a menos de 10 metros, con igual distribución en El Pozo (n=9) y Los Filtros (n=9). El 88,8% (n=16) de las viviendas, principalmente en El Pozo (n=9) tienen matas de café o cacao a menos de 10 metros. La mitad de los hogares (50%, n=9) cuentan con sitios para almacenar cosechas a menos de 10 metros, sobre todo en Los Filtros. En cuanto a la basura, el 83,3% (n=15) de los habitantes la ubican a más de 10 metros de la vivienda, especialmente en Los Filtros (n=9), mientras que el 16,6% (n=3) en la zona El Pozo, la tienen dentro de los 10 metros de la vivienda. La proximidad de estos elementos, particularmente del bosque húmedo, puede influir en la presencia de vectores de *leishmania*, ya que estos insectos se desarrollan en ambientes cálidos y húmedos y encuentran en la vegetación un hábitat propicio para su reproducción.

En el peridomicilio de las viviendas estudiadas, se observó que el 72,2% (n=13) tiene gallineros y depósitos de leña, tanto en la zona de El Pozo (n=8) como en Los Filtros (n=7). Solo un 5,5% (n=1) cuenta con cochineras, ubicada en la zona de El Pozo. En cuanto a la disposición de excretas, la mayoría (94,4%, n=17) tiene baños conectados a pozos sépticos, sobre todo en El Pozo (n=9), mientras que un 5,5% (n=1) usa letrinas en Los Filtros.

Sobre la recolección de basura, el 50,0 % (n=9) la arroja en cualquier lugar, con mayor incidencia en Los Filtros (n=6) seguido de El Pozo (n=3). El 33,3% (n=6) utiliza recolección municipal, exclusivamente en El Pozo, y un 16,6% (n=3) quema la basura particularmente en Los Filtros. En cuanto a los reservorios de *Leishmania*, el 66,6% (n=12) de los habitantes, convive con animales, principalmente perros, destacando la zona El Pozo (n=7).

Respecto a las características clínicas de los habitantes y que forma parte del criterio de inclusión, el 16,6% (n=3) presentó lesiones activas sugestivas de leishmaniasis, todas en Los Filtros. En ambas zonas, el 100% (n=18) de los habitantes tenían lesiones curadas. En cuanto al tratamiento, el 83,3% (n=15) recibió tratamiento sanitario y el 16,6% (n=3) utilizó métodos caseros.

Al analizar las variables, no se encontró asociación estadísticamente significativa en la mayoría de los factores (Condición de la vivienda [paredes: $\chi^2 = 4,10$; $p = 0,129$; techos: $\chi^2 = 2,56$; $p = 0,464$; pisos: $\chi^2 = 4,02$; $p = 0,134$]; Alrededores de la vivienda: $\chi^2 = 3,11$; $p = 0,090$; Anexos en el peridomicilio: $\chi^2 = 1,39$; $p = 0,271$; Disposición de excretas: $\chi^2 = 0,95$; $p = 0,330$; Convive con animales: $\chi^2 = 0,69$; $p = 0,405$; Tipo de lesión: $\chi^2 = 2,17$; $p = 0,479$; Tratamiento recibido: $\chi^2 = 0,53$; $p = 0,466$), sin embargo, sí hubo asociación estadística entre la recolección de basura ($\chi^2 = 10,97$; $p = 0,004$) y la presencia de vectores de *leishmania* en la zona estudiada. Este hallazgo resalta la importancia de la gestión adecuada de residuos para controlar la propagación de los vectores, que encuentran en los residuos un ambiente propicio para desarrollarse.

Además de analizar las características clínicas y epidemiológicas de los habitantes de la comunidad y la distribución geoespacial de las especies de flebótomos colectados; se realizó un análisis molecular por lotes de *Lutzomyia* según

especie, zona y número de trampa, con el fin de determinar la prevalencia de infección natural por *Leishmania* spp.

Medida de la concentración y pureza del ADN a partir de *Lutzomyia*

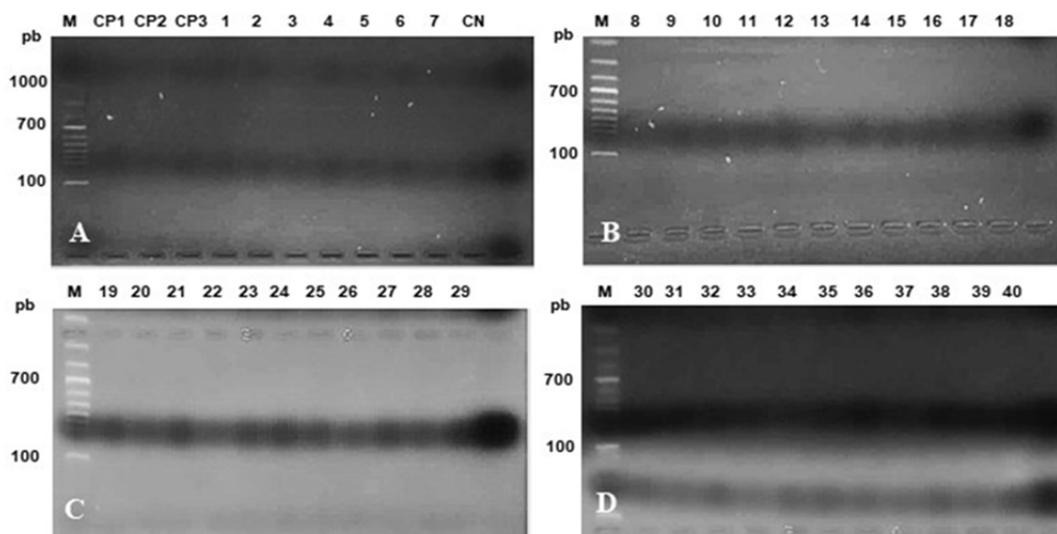
La Tabla 3 compara cuatro protocolos diferentes utilizados para evaluar la concentración y pureza del ADN extraído, con el objetivo de determinar la metodología que ofrece el mejor rendimiento para el análisis molecular. Estos protocolos se realizaron antes del ensayo de extracción de ADN en los lotes de *Lutzomyia*, clasificados según especie, zona y número de trampa. Los métodos evaluados fueron: sonicación con el disruptor de ultrasonido, homogeneizador de tejidos, maceración con mortero y lisis con proteinasa K. Los resultados mostraron que con la maceración se obtiene un ADN de mayor concentración, pero con baja pureza, mientras que la lisis con proteinasa K resulta en un rendimiento bajo, pero con mejor pureza. Finalmente, se optó por usar el homogeneizador de tejidos debido a que proporciona un mejor rendimiento en términos de concentración y pureza del ADN extraído.

Tabla 3. Medida de la concentración y pureza del ADN con los protocolos de extracción evaluados.

Protocolo de extracción	A₂₆₀ nm	A₂₈₀ nm	[] ng/μL	A_{260/280} nm
Sonicación con ultrasonido	0,068	0,061	34,0	1,114
Homogeneizador de tejidos	0,071	0,056	35,5	1,267
Maceración con mortero	0,134	0,111	67,0	1,207
Lisis con proteinasa K	0,057	0,039	28,5	1,461

Determinación de los complejos de *Leishmania* mediante PCR múltiple de la región intergénica de miniexón

La Figura 9 muestra los resultados de la amplificación del ADN de *Leishmania* spp. mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando los lotes de *Lutzomyia* 1 al 40. En los geles A, B, C y D de la Figura 9 se muestran las corridas electroforéticas de las muestras 1 a 40. Lamentablemente, no se detectó infección natural por *Leishmania*, ya que no se observó la amplificación de bandas de la región intergénica del miniexón, al compararlas con un marcador de tamaño de 100 pb. Esta ausencia de bandas características, incluso en los controles, evidencia una limitación de la técnica molecular utilizada y sugiere que los controles podrían haber estado



deteriorados. Para mejorar la fiabilidad de los resultados, se recomienda optimizar las condiciones experimentales de amplificación y utilizar controles de calidad óptima en futuros estudios. Estos ajustes permitirían una mejor separación y visualización de las bandas, incrementando la precisión y validez de los hallazgos.

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación de ADN de *Leishmania* en los lotes de *Lutzomyia*, muestras 1 al 40, teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Se emplearon oligonucleótidos LU-5A, LB-3C, LM-3A y LC-3L de la región intergénica de miniexón de los complejos de *Leishmania*. M= marcador de tamaño molecular 100 pb. Canal CP1= control positivo *L. braziliensis*

(PH8), CP2= control positivo *L. mexicana* (S66), CP3= control positivo *L. chagasi* (515), 1 al 40= muestras de ADN de lotes de *Lutzomyia* 1 a 40, CN= control negativo.

DISCUSIÓN

En esta investigación se determinó la diversidad y abundancia de especies de flebótomos presentes en las zonas rurales del caserío Las Marías, utilizando el *software* QGIS para actualizar el inventario de especies epidemiológicamente importantes como vectores de leishmaniasis. Los resultados obtenidos en las zonas de El Pozo y Los Filtros, donde se colectaron 155 ejemplares adultos del género *Lutzomyia*, distribuidos en cuatro especies: *Lu. ovallesi*, *Lu. panamensis*, *Lu. olmeca bicolor* y *Lu. gomezi*, son significativos y revelan una distribución variada de las especies en las zonas estudiadas.

Las especies más predominantes en los puntos de muestreo del área de estudio fueron *Lu. ovallesi* y *Lu. panamensis*, en particular, la predominancia de *Lu. ovallesi* con un 71,6% del total de ejemplares colectados sugiere una alta adaptabilidad de esta especie a las condiciones locales, similar a lo encontrado por Jorquera *et al.* (2005) en el estado Sucre, Venezuela, con abundancias relativas de 82,75% y 17,42%, respectivamente ⁽³³⁾. *Lu. ovallesi*, una especie con amplia distribución desde Centroamérica hasta el norte de Sudamérica, ha sido incriminada como transmisor de *Leishmania* en Venezuela, Guatemala, Panamá, Belice y Colombia. En Venezuela, es el principal vector de LC, frecuentemente encontrado cerca de viviendas en distintas altitudes de los Andes venezolanos ⁽³⁴⁾. La presencia de *Lu. panamensis* en un 16,1% destaca su relevancia epidemiológica, dada su asociación con la transmisión de LC y la dominancia de esta especie puede variar significativamente según el microhábitat, algo que se observa en la distinción entre las zonas de El Pozo y Los Filtros.

La identificación de *Lu. olmeca bicolor* y *Lu. gomezi* con un 9,0% y 3,2% respectivamente, es particularmente notable ya que estos representan los primeros registros de estas especies en el estado Carabobo. Esto amplía la comprensión de la

distribución geográfica de estos flebotómicos y coincide con los hallazgos de Galati y Young y Duncan ^(19,20), quienes destacaron la importancia de estudios morfológicos detallados para la correcta identificación de especies en nuevas áreas geográficas. Según Cazorla-Perfetti (2015), sobre el listado taxonómico de las especies de flebótomos (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) descritas hasta el presente para Venezuela; *Lu. olmeca bicolor* se distribuye en seis entidades federales y *Lu. gomezi* tiene una amplia distribución geográfica en Venezuela ⁽³⁵⁾.

El comportamiento de *Lu. gomezi* es consistente con estudios previos que asocian su abundancia a mayores elevaciones y proximidad a vegetación diversa, cultivos y que es la especie con mayor número de asociaciones positivas específicamente con animales (porcinos, bovinos, caprinos), así como coberturas boscosas, cultivos de caña y frutales de mango, la cual podría adaptarse fácilmente a diferentes ambientes ^(36,37). Por otra parte, esta especie incrementa su abundancia hacia la época de sequía (diciembre, enero, febrero), consistente con los meses de muestreo de este estudio y cuando existe mayor cantidad de hojarasca ⁽³⁸⁾.

El ambiente selvático del caserío Las Marías, junto con la presencia de animales reservorios y la intervención humana al modificar la cubierta vegetal, crea un entorno propicio para los flebótomos, similar a lo documentado por Valderrama *et al.* (2011), quienes correlacionaron la distribución geográfica de flebótomos con factores ecológicos, climáticos y antropogénicos ⁽³⁹⁾. Según Costa Feitosa y Castellón (2006), la composición de especies de flebótomos puede ser influenciada por las condiciones geográficas y microclimáticas ⁽⁴⁰⁾. Además, Contreras (2013) señala que la destrucción de ecosistemas naturales por la deforestación afecta la dinámica de transmisión de leishmaniasis, así como en la vegetación y en la abundancia de especies, donde algunas desaparecen y otras se tornan más abundantes ⁽³⁰⁾.

Las diferencias en la cantidad y especies de flebótomos encontrados en las zonas de muestreo de Los Filtros y El Pozo, en los meses de octubre a diciembre, temporada que correspondió a la finalización del invierno en la zona, podría estar influenciado por factores intrínsecos (inherentes a la especie) y factores extrínsecos (relativos al ambiente que inciden sobre la especie) así como la distribución y abundancia de hospedadores vertebrados ⁽⁴¹⁾. En este estudio, se usaron trampas de luz tipo CDC para la captura de insectos, revelando grandes diferencias en la cantidad de flebótomos colectados por sitio de muestreo. La zona de Los Filtros representó la zona con mayor cantidad de flebótomos y menor diversidad de especies (72/133), lo cual puede relacionarse a la presencia de casos activos en ese momento, tratamiento inadecuado y factores como la altitud, clima, así como preservación de la vegetación en la zona, que contribuye a un hábitat propicio para la presencia y reproducción de vectores de leishmaniasis.

Por el contrario, la zona de El Pozo mostró menor abundancia de flebótomos pero mayor diversidad de especies (61/133), posiblemente debido a la altitud y humedad generada por el cauce del río, además de la ausencia de casos activos, lo que concuerda con Feliciangeli (1987) quien reportó de captura de *Lu. gomezi* en poca abundancia en el caserío San Esteban, estado Carabobo, en la región central de Venezuela, atribuyéndole a la baja altitud de la zona (85 m) como una de las posibles explicaciones a este fenómeno ⁽⁴²⁾.

Adicionalmente, *Lu. gomezi* posee una actividad hematófaga con picos entre las 18:00 y 20:00 h. Esta especie exhibe una notable preferencia por picar a los humanos en lugares como en los alrededores del domicilio humano, o en las zonas deforestadas, donde la vegetación es escasa. Esto sugiere que esta especie se encuentra adaptada a los recientes cambios medio-ambientales, modificando su conducta de alimentación y, en consecuencia, posiblemente alterando los patrones de transmisión de enfermedades. Por su parte, *Lu. olmeca bicolor* es una especie que

posee hábitos antropofílicos y fotofílicos, siendo frecuentemente capturada tanto dentro de las viviendas como en áreas silvestres (bosque húmedo tropical y bosque muy húmedo tropical pre-montano) no fragmentadas, así como en áreas de cultivo. Esta capacidad para prosperar en distintos hábitats resalta su versatilidad y adaptación a diversas condiciones ambientales ⁽³⁵⁾.

Desafortunadamente, no se llevó a cabo una caracterización completa y detallada del hábitat en cada sitio de colecta. Por ende, cualquier conclusión sobre los factores específicos que podrían estar influyendo en las diferencias observadas entre los sitios de colecta es meramente especulativa. Sin una descripción exhaustiva del ambiente, resulta difícil identificar con precisión los elementos que podrían estar causando estas variaciones en las colectas. Es necesario llevar a cabo estudios futuros más exhaustivos y detallados para poder esclarecer estos factores.

La distribución geoespacial de las especies en la comunidad de Las Trincheras reveló que *Lu. gomezi* y *Lu. olmeca bicolor* predominaban en El Pozo, mientras que *Lu. ovallesi* y *Lu. panamensis* eran más frecuentes en Los Filtros. Los mapas de calor mostraron una correlación entre la presencia de estas especies y las zonas de riesgo de infección por *Leishmania*, lo que demuestra la eficacia en la visualización de datos epidemiológicos y entomológicos para la planificación de intervenciones de salud pública.

A nivel molecular, no se logró detectar infección natural debido a que los controles no funcionaron, probablemente por deterioro. Es esencial obtener nuevos controles para mejorar la reacción de PCR y verificar la veracidad de estos resultados. No obstante, la disponibilidad de cepas de *Leishmania* en el país es cada vez más limitada, y los laboratorios que cultivan estas cepas también están disminuyendo, complicando la obtención de controles de calidad. Esta situación subraya la urgencia

de fortalecer la infraestructura y los recursos para la investigación y control de *Leishmania* en el país, garantizando así resultados más fiables en futuros estudios.

Finalmente, la asociación significativa encontrada entre la recolección inadecuada de basura y la presencia de vectores de *leishmania* subraya la necesidad de mejorar las prácticas de gestión de residuos en estas comunidades. La variación en la distribución y abundancia de las especies de *Lutzomyia* está influenciada por factores ambientales y antrópicos, siendo crucial el manejo adecuado de los residuos y la vegetación circundante para reducir el riesgo de transmisión de leishmaniasis. Estudios futuros deben enfocarse en la implementación de intervenciones basadas en estos hallazgos para mitigar la propagación de la enfermedad.

CONCLUSIONES

- Se identificaron y clasificaron 155 ejemplares adultos de vectores de *Leishmania* spp., de los cuales 133 (85,8%) eran hembras y 22 (14,2%) machos. La alta proporción de hembras incrementa el riesgo de transmisión.
- Entre las especies predominantes *Lu. ovallesi* representó el 71,6% (n=111), *Lu. panamensis* el 16,1% (n=25), *Lu. olmeca bicolor* el 9,0% (n=14), y *Lu. gomezi* el 3,2% (n=5).
- En cuanto a la distribución espacial en Los Filtros, *Lu. ovallesi* fue predominante en el 41,9% (n=65) de las viviendas y *Lu. panamensis* en el 3,9% (n=6) mientras que, en el Pozo, *Lu. ovallesi* se encontró en el 22,6% (n=35) de las viviendas y *Lu. panamensis* en el 6,5% (n=10).
- Se encontraron las especies *Lu. olmeca bicolor* y *Lu. gomezi* en 4 viviendas (7,7%, n=12 y 2,6%, n=4) respectivamente, siendo los primeros registros para el estado Carabobo.
- La densidad de vegetación, el clima, la temperatura, las condiciones socioeconómicas y sociosanitarias inadecuadas favorecen la persistente aparición de casos de leishmaniasis en la zona, identificándose áreas de mayor riesgo en un posible mapeo.
- No se obtuvo evidencia de infección natural por *Leishmania* spp. mediante PCR múltiple, sugiriendo la necesidad de ajustar las técnicas moleculares utilizadas.
- Es importante implementar medidas de control y prevención de la leishmaniasis en el caserío Las Marías y realizar estudios más detallados sobre *L. gomezi* y *L. olmeca-bicolor* en el estado Carabobo.

RECOMENDACIONES

- Incrementar los recursos para la realización de estudios taxonómicos y eco epidemiológicos más amplios y cuya duración sea mínimo de 1 año, con el fin de proporcionar información nueva y útil sobre las especies *Lu. olmeca-bicolor* y *Lu. gomezi* en el edo. Carabobo.
- Determinar la existencia de otros posibles reservorios dentro de la amplia variedad de especies domésticas y silvestres que puedan estar infectadas, con el fin de investigar su relación con la abundancia del vector.
- Ampliar las zonas de muestreo del caserío las Marías para desarrollar mapas predictivos de abundancia de flebótomos que facilitarían el diseño de programas de control del vector en toda la comunidad.
- Realizar ensayos continuos para la determinación de los complejos de *Leishmania* mediante PCR múltiple de la región intergénica de miniexón con nuevos controles positivos de las cepas de *Leishmania* en cultivo *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. donovani*.
- Los hallazgos de esta investigación deben ser utilizados como referencia para el desarrollo de programas de salud epidemiológicos destinados al control endémico de la leishmaniasis. Implementar estos programas en áreas endémicas ayudará a monitorear y reducir la incidencia de la enfermedad, mejorando la calidad de vida de las comunidades afectadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sánchez-Saldaña L, Sáenz-Anduaga E, Pancorbo-Mendoza J, Zegarra-Del-Carpio R, Garcés-Velasco N, Regis-Roggero A. Leishmaniasis. *Dermatol Peru*. 2004; 14(2): 82-98.
2. Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis [Internet]. Washington: OPS; 2022 [consulta 10 de Marzo de 2024]. Disponible en: <https://bit.ly/3WSr3yG>
3. Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis [Internet]. Washington: OMS; 2023 [consulta 10 de Marzo de 2024]. Disponible en: <https://bit.ly/2FWFP2d>
4. Abdel K, Hernández D, Hidalgo O, Hidalgo S, Hung F, Lorenzo C, *et al*. Características clínicas-epidemiológicas y conocimiento sobre la leishmaniosis tegumentaria americana en una población de Carabobo. Venezuela. *Rev Peru Investig Salud*. 2020; 4(1): 09-16.
5. Organización Panamericana de la Salud. Sistema de Información Regional de Leishmaniasis en las Américas (SisLeish) [Internet]. Washington: OPS; 2022 [consulta 10 de Marzo de 2024]. Disponible en: <https://bit.ly/3sUkPUH>
6. De Lima H, Borges RH, Escobar J, Convit J. Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007. *Bol Mal Salud Amb*. 2010; 50(2): 283-300.
7. Feliciangeli MD. Leishmaniasis en Venezuela: situación actual, acciones y perspectivas para el control vectorial en el marco de un programa de control multisectorial. *Bol Mal Salud Amb*. 2014; 54(1): 1-7.
8. Torres-Castro MA, Noh-Pech HR, Lugo-Caballero CI, Dzul-Rosado KR, Puerto FI. Las enfermedades transmitidas por vector: importancia y aspectos epidemiológicos. *Bioagrobiencias*. 2020; 13(1): 31-41.

9. Vásquez L, Sierra D, Rojas E. Mecanismos de transmisión de la leishmaniasis. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2002; 22(2): 182-7.
10. Capucci DC, Campos AM, Reis Soares JV, Vieira Ramos VD, Binder C, Lima MA, *et al.* Ecology and natural infection of phlebotomine sand flies in different ecotopes and environments in the municipality of Pains, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop.* 2023; 238: 106789.
11. Rujano M, Rondón Y, Sánchez M, Rondón M, Nieves B, Nieves E. Ocurrencia espacial de flebotominos del género *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en el Estado Mérida Venezuela. *Revista CLIC.* 2021; 23: 13-27.
12. Alemán-Santos M, Martínez-Pérez L, Rivero-Rodríguez M, Cortes-Alemán L, Pérez-Doria A, Bejarano-Martínez E. Detección de *Leishmania* spp. (Trypanosomatidae) e identificación de ingestas sanguíneas en flebotomíneos de un nuevo foco de leishmaniasis en el Caribe colombiano. *Cienc Innov Salud.* 2021; e142: 311-24.
13. Villarreal RG, Herrera G, Muskus CE. Identificación de especie de *Leishmania* mediante PCR en tiempo real acoplada a curvas de fusión de alta resolución. *Rev Cubana Med Trop.* 2021; 73(3): e660.
14. Crónica Uno. Insalud guarda silencio en casos de leishmaniasis en Carabobo [Internet]. Venezuela: *cronica.uno*; 2021 [consulta 09 de octubre de 2022]. Disponible en: <https://bit.ly/48cqPbL>
15. Gelvez. Guías de Venezuela: Las Marías, municipio Naguanagua estado Carabobo [Internet]. Venezuela: *gelvez.com.ve*; 2022 [consulta 19 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://bit.ly/3MDEr4w>
16. Martínez M, Briones R, Cortés J. Metodología de la Investigación para el área de la Salud. 2da Edición. México: McGraw Hill Interamericana; 2013.
17. Maroli M, Feliciangeli MD, Arias J. Métodos de captura, conservación y montaje de los Flebótomos (Diptera: Psychodidae). Washington: OPS; 1997.
18. Arroyo Castro L. El consentimiento informado en la investigación científica. Marco jurídico. *Rev Jur Seg Soc.* 2004; 13: 83-96.

19. Galati EAB. Morfologia e terminologia de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Classificação e identificação de táxons das Américas. Vol I. Brasil: Universidade de São Paulo; 2023.
20. Young D, Duncan M. Guide to identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Am Entomol Inst. 1994; 54: 1-881.
21. Rivero J, Pernalet M, Urdaneta L, Zoghbi N, Rubio-Palis Y, Herrera F. Optimization of extraction procedure for mosquito DNA suitable for PCR-based techniques. Int J Trop Insect Sci. 2004; 24(3): 266-9.
22. Reyes J, Vietri M, Rivas A, Lares M, Herrera L, Aguilar CM, *et al.* Estandarización de la técnica de PCR para la detección de ADN de *Leishmania* sp. en muestras de sangre de caninos. Rev Fac Cs Vets. 2015; 56(2): 67-74.
23. Sambrook J, Russel D. Molecular cloning: a laboratory manual. 3^{ra} Edición. USA: Cold Spring Harbor; 2001.
24. Luque J, Herráez Á. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética: Concepto, técnicas y aplicaciones en Ciencias de la Salud. España: Harcourt S.A.; 2001.
25. Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. (1998). Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. J Clin Microbiol. 1998; 36(7): 1989-95.
26. Da Silva L, De Sousa S, Da Graça G, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. Infect Genet Evol. 2010; 10(1): 77-83.
27. Castilho T, Shaw J, Floeter-Winter L. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J Clin Microbiol. 2003; 41(2): 540-6.

28. Zemanova E, Jirkú M, Mauricio I, Horák A, Miles M, Lukes J. The *Leishmania donovani* complex: Genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. *Int J Parasitol.* 2007; 37(2): 149-60.
29. Christensen HA, Fairchild GB, Herrer A, Johnson CM, Young DG, Vásquez AM. The ecology of cutaneous Leishmaniasis in the Republic of Panama. *J Med Entomol.* 1983; 20: 463-84.
30. Contreras MA. *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) en zonas cafeteras de la región andina colombiana: taxonomía e importancia médica. [Tesis para optar al título de Magister en Entomología]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2013.
31. Romero RL, Meza NL, Pérez DA, Bejarano E. *Lutzomyia abonnenci* y *Lutzomyia olmeca bicolor* (Diptera: Psychodidae), nuevos registros para el Departamento de Sucre, Colombia. *Acta biol Colomb.* 2013; 18(2): 375-80.
32. Feliciangeli MD. Hourly Activity of *Lutzomyia ovallesi* and *L. gomezi* (Diptera: Psychodidae), Vectors of Cutaneous Leishmaniasis in Northcentral Venezuela. *J Med Entomol.* 1997; 34(2): 110-5.
33. Jorquera A, González R, Marchán-Marcano E, Oviedo M, Matos M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100(1): 45-8.
34. Nieves E, Rondón M. Metacicloogénesis y desarrollo de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae). *Rev Soc Ven Microbiol.* 2010; 30(2): 121-7.
35. Cazorla-Perfetti D. Lista comentada de los flebotominos (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) citados para Venezuela. *Saber.* 2015; 27(2): 178-231.

36. Mogollón J, Manzanilla P, Scorza J. Distribución altitudinal de nueve especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en el estado Trujillo, Venezuela. Bol Dir Malariol San Amb. 1977; 17(3): 206-229.
37. Niño L, Pérez-Español S. Distribución geográfica y factores ambientales asociados a flebotomíneos del género *Lutzomyia* França, 1924 (Diptera: Psychodidae) en Cundinamarca, Colombia. Rev Chil Entomol. 2021; 47(2): 275-303.
38. Perruolo G. Aspectos ecológicos de *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) en un foco endémico de Leishmaniasis Cutánea en el Estado Táchira, Venezuela. Bol Malariol Salud Amb. 2004; 44(1): 35-44.
39. Valderrama A, Tavares M, Andrade J. Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae), vectors of cutaneous Leishmaniasis in Panama. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 106(8): 1024-31.
40. Costa Feitosa MA, Castellón EG. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos de floresta ao redor de conjunto habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. I. Estratificação Vertical. Acta Amaz. 2006; 36(4): 539-48.
41. Ostfeld RS, Roy P, Haumaier W, Canter L, Keesing F, Rowton E. Sand Fly (*Lutzomyia vexator*) (Diptera: Psychodidae) populations in upstate New York: Abundance, microhabitat, and phenology. J Med Entomol. 2004; 41(4): 774-8.
42. Feliciangeli MD. Ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae) in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in Northern Venezuela: III. Seasonal fluctuation. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987; 82(2): 167-76.

ANEXOS

ANEXO A: Consentimiento informado para colocación de trampas



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS-SEDE CARABOBO
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PARÁSITOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS “DR. FRANCISCO J. TRIANA ALONSO”

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Entre el Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP) y el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (Instituto BIOMED) se lleva a cabo la investigación titulada: **“Distribución espacial y prevalencia de infección natural por *Leishmania* spp. en *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) colectados en la comunidad Las Trincheras, municipio Naguanagua, estado Carabobo, 2023”**.

Dirigido a todo el grupo familiar del caserío Las Marías, comunidad Las Trincheras del municipio Naguanagua estado Carabobo para el diagnóstico de infección natural por *Leishmania* en mosquitos transmisores de leishmaniasis, que es una enfermedad que se ha reportado en esta zona.

Yo, _____, portador(a) de la C.I. N° _____, representante de la familia _____, hago constar que he sido informado(a) del propósito de esta investigación, que he hecho las preguntas que me surgieron y he recibido información suficiente sobre el mismo. Así mismo doy mi consentimiento y autorización para la colocación de trampas de luz en los alrededores de mi vivienda para atrapar los mosquitos y se le realicen los estudios de diagnóstico en los laboratorios de la Universidad y se confirme la presencia de insectos infectados por *Leishmania*. Los investigadores responsables me garantizan confidencialidad y se han comprometido a darme información oportuna sobre cualquier inquietud relacionada con la investigación. Entiendo que conservo el derecho de retirar la participación de mi grupo familiar del estudio, en cualquier momento que desee.

Firma del Jefe de Familia

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR:

Luego de haber explicado detalladamente al participante la naturaleza del protocolo mencionado. Certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médica, de idioma o de instrucción han impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este estudio.

Nombre del Investigador: _____

C.I.: _____

Lugar: _____

Firma del Investigador: _____

Fecha: _____

ANEXO B: Formato de información relacionado con el tipo de vivienda



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS-SEDE CARABOBO
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PARÁSITOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS “DR. FRANCISCO J. TRIANA ALONSO”



INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Proyecto de Investigación: “**Distribución espacial y prevalencia de infección natural por *Leishmania* spp. en *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) colectados en la comunidad Las Trincheras, municipio Naguanagua, estado Carabobo, 2023**”.

El presente formato de recolección de datos tiene como objetivo determinar las características estructurales de las viviendas seleccionadas. Se realiza con fines investigativos.

Formato N° _____ **Encuestador:** _____ **Fecha:** / / 2023

Zona: _____ **Casa N°:** _____ **Jefe de Familia:** _____

Características de la Vivienda:

- Ubicación:** Urbana _____ Periurbana _____ Rural _____
- Tipo de Vivienda:** Quinta _____ Casa _____ Vivienda rural _____ Rancho _____ Otro _____
- La vegetación y el área de los alrededores de la vivienda es:** Bosque húmedo a < 10 m. de la vivienda (peridomicilio) _____ Bosque húmedo a > 10 m. de la vivienda _____ Arbusto y césped rodeando la vivienda < 10 m _____ Arbusto y césped rodeando la vivienda > 10 m _____ Matas de café o cacao < 10 m _____ Matas de café o cacao > 10 m _____ Sitios para almacenar cosechas dentro de los 10 m. de la vivienda _____ Basura dentro de los 10 m. de la vivienda _____ Basura a > de 10 m. de la vivienda _____ Nada de basura ni vegetación cerca de la vivienda _____
- Material del techo:** Platabanda _____ Teja _____ Machihembrado _____ Láminas asfálticas _____ Láminas metálicas (zinc/acerolit) _____ Asbesto _____ Palma _____
- Material de las paredes:** Bloques o ladrillo sin frisar _____ Bloques o ladrillo frisado _____ Concreto _____ Madera aserrada, fórmica, fibra de vidrio y similares _____ Adobe, tapia o bahareque frisado _____ Adobe, tapia o bahareque sin frisar _____ Otros (palmas, tablas o similares) _____
- Material del piso:** Mármol, mosaico, granito, vinil, cerámica, ladrillo, terracota y similares _____ Madera _____ Cemento _____ Tierra _____ Otros _____

7. **Estructura de la casa, ¿Cuántos tiene?:** Cocina _____ Sala _____ Dormitorios _____ Baños _____ Porche _____
8. **Cantidad de personas que habitan la vivienda:** _____
9. **Cuántos dormitorios posee la vivienda:** _____
10. **Cuántos duermen por habitación:** Habitación 1 _____ Habitación 2 _____ Habitación 3 _____ Otro _____
11. **Cantidad de personas con lesiones activas o curadas:** Con lesiones activas _____ Con lesiones curadas _____
12. **De las personas con lesiones curadas el tratamiento fue:** Casero _____ Por Sanidad _____
13. **Cuántas personas laboran en oficios del campo y donde:** _____ Ubicación _____
14. **Presencia de anexos en el peridomicilio:** Gallinero _____ Palomar _____ Conejera _____ Cochineras _____ Corral _____ Depósito de leña _____ Trojas _____ Otros _____
15. **El agua llega a la vivienda por:** Acueducto o tubería _____ Camión cisterna _____ Pila pública o estanque _____ Pozo con tubería o bomba _____ Pozo o manantial protegido _____ Otros medios _____
16. **Lugar de disposición de excretas:** Baño con poceta conectada a cloaca _____ Baño con poceta conectada a pozo séptico _____ Poceta sin conexión a cloaca o a pozo séptico _____ Excusado de hoyo o letrina _____ A cielo abierto _____
17. **La vivienda dispone de:** Electricidad _____ Teléfono _____ Gas _____ Radio _____ Televisión _____ Bicicleta _____ Motocicleta _____ Auto/Camioneta _____ Alcantarillado _____ Tanque de agua _____
18. **La recolección de basura y desecho se realiza en:** Recolección municipal _____ Quemada _____ Enterrada _____ Cielo abierto _____ Se arroja en cualquier lugar _____
19. **Convive en su casa con animales:** Perros _____ Gatos _____ Gallinas/pollos _____ Otros _____
20. **Posee animales caninos en la vivienda:** Si _____ No _____
21. **En caso de si, cantidad _____ En caso de si, le observó lesiones _____**

Gracias por su colaboración

ANEXO C: Reporte de funcionamiento de trampas de luz CDC



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS-SEDE CARABOBO
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PARÁSITOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS “DR. FRANCISCO J. TRIANA ALONSO”

Entre el Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP) y el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” (Instituto BIOMED) se lleva a cabo la investigación titulada: **“Distribución espacial y prevalencia de infección natural por *Leishmania* spp. en *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) colectados en la comunidad Las Trincheras, municipio Naguanagua, estado Carabobo, 2023”**.

Dirigido a todo el grupo familiar del caserío Las Marías, comunidad Las Trincheras del municipio Naguanagua estado Carabobo para el diagnóstico de infección natural por *Leishmania* en mosquitos transmisores de leishmaniasis, que es una enfermedad que se ha reportado en esta zona.

REPORTE DE FUNCIONAMIENTO DE TRAMPAS DE LUZ CDC

Formato N° _____ **Colector:** _____ **Fecha:** / / 2023

Cant. Trampas: _____ N° Viviendas seleccionadas: _____ Hora Inicio: _____ Hora Finaliza:

N° trampa	Zona	Casa	Jefe familia	Latitud	Longitud	Estado de la trampa CDC durante la noche			
						E	SA	PL	Observaciones

E= Encendida; SA= Se apagó; PL= Poca luz



D: Ficha de recolección y reporte de insectos

**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS-SEDE CARABOBO
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PARÁSITOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS “DR. FRANCISCO J. TRIANA ALONSO”**

FICHA DE RECOLECCIÓN Y REPORTE DE INSECTOS

Proyecto de Investigación: “**Distribución espacial y prevalencia de infección natural por *Leishmania* spp. en *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) colectados en la comunidad Las Trincheras, municipio Naguanagua, estado Carabobo, 2023**”.

El presente formato de recolección y reporte de insectos tiene como objetivo determinar las características ambientales del hábitat y la morfología de los insectos capturados. Se realiza con fines investigativos.

Formato N° _____ **Colector:** _____ **Fecha de colecta:** / / 2023

Zona: _____ **Casa N°:** _____ **Jefe de Familia:** _____ **Tipo de trampa:** _____

N° trampa: _____ **Sitio de colecta:** _____ **Latitud:** _____ **Longitud:** _____

Condiciones del Ambiente:

Lluvia: _____ **Humedad mínima:** _____ **Humedad máxima:** _____

Viento: _____ **Temperatura mínima:** _____ **Temperatura máxima:** _____

Criterio: 1) Ausente; 2) Suave; 3) Moderado; 4) Fuerte

Descripción de la Captura:

N° insectos: _____ **N° flebótomos:** _____ **N° hembras:** _____ **N° machos:** _____

Características generales	Características hembras

Identificación: Orden: _____ Familia: _____ Género: _____ Especie: _____

Conservación en etanol 90%: _____

Montaje para taxonomía: _____