

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



Identificación de especies de flebotominos (Diptera: Psychodidae) y búsqueda de fuentes alimenticias e infección natural con *Leishmania* spp., en flebotominos de dos localidades de Pérez Zeledón, Costa Rica.

Lic. Elisa María Alcántara Henríquez

Universidad Nacional, Heredia, Marzo 2023

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales para optar por el grado académico de Magíster en Enfermedades Tropicales.

Identificación de especies de flebotominos (Diptera: Psychodidae) y búsqueda de fuentes alimenticias e infección natural con *Leishmania* spp., en flebotominos de dos localidades de Pérez Zeledón, Costa Rica.

Elisa María Alcántara Henríquez

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales para optar por el grado académico de Magíster en Enfermedades Tropicales.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

M.Sc. Randall Gutiérrez Vargas
Representante del Consejo Central de Posgrado

Dra. Sandra Estrada König
Coordinadora del Posgrado o su representante

M.Sc. Silvia Argüello Vargas
Tutora de tesis

PhD. Gaby Dolz Wiedner
Miembro del comité Asesor

PhD. Ana Jiménez Rocha
Miembro del comité Asesor

Lic. Elisa María Alcántara Henríquez
Sustentante

Resumen General

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo. El agente etiológico es un protozoo intracelular perteneciente al género *Leishmania*, que en el continente de América es transmitido principalmente a través de insectos del género *Lutzomyia*. Esta enfermedad presenta cuadros clínicos que van desde lesiones cutáneas (LC), mucocutáneas (LMC) y viscerales (LV) de acuerdo con la especie de *Leishmania* que se encuentre parasitando. En Costa Rica, tanto la leishmaniasis cutánea como la mucocutánea representan una enfermedad crónica y endémica. En el país, *Leishmania panamensis*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania infantum/chagasi* son las especies causantes de LC, LMC y LV respectivamente. En cuanto al vector, existen 19 especies antropofílicas de flebótomos siendo *Lutzomyia ylephiletor* y *Lutzomyia trapidoi* los vectores incriminados en la transmisión de LC y LMC, mientras que *Lutzomyia longipalpis* está incriminada en la transmisión de LV en el país. El presente estudio tuvo como objetivos determinar las especies de flebótomos que se encuentran en dos localidades del distrito Daniel Flores en Pérez Zeledón, así como detectar la infección natural de *Leishmania* spp. además de identificar las fuentes alimenticias. Se realizaron muestreos por tres noches consecutivas durante los meses de abril a agosto del 2021 en las localidades de Las Brisas y Concepción en Pérez Zeledón. Utilizando trampas de luz CDC se recolectaron 282 especímenes, identificándose 15 especies de flebotominos de las cuales 11 son consideradas antropofílicas y 9 de importancia epidemiológica. Las especies de *Lu. triramula*, *Lu. cruciata* y *Lu. serrana* fueron las más abundantes. En cuanto a la determinación de fuentes alimenticias e infección por *Leishmania* spp., se formaron grupos de hembras sin alimentar de acuerdo a la especie, localidad y gira, las hembras que se encontraron ingurgitadas con sangre fueron separadas y analizadas individualmente. Por medio de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (q-PCR) se detectaron cuatro muestras positivas a *Leishmania* spp, las cuales fueron sometidas a un PCR de tiempo final amplificando un producto de 330 pb de la región ITS-1 de *Leishmania* spp. las cuales posteriormente fueron secuenciadas. Los resultados de las secuencias mostraron que un grupo y una hembra ingurgitada de *Lu. trapidoi* estaban infectados con *L. braziliensis* (100% de similitud en GenBank), mientras que en un grupo de *Lu. triramula* y en una hembra ingurgitada de *Lu. ovallesi* las secuencias coincidían con aislamientos sin identificar de *Leishmania* spp. En cuanto a la determinación de fuentes alimenticias, el análisis por PCR mostró que 17 muestras (54.8%) resultaron positivas para ADN de aves y 14 muestras (45.2 %) pertenecían a ADN de mamífero, en este trabajo no se detectó ADN de humanos. Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen al conocimiento de la distribución y diversidad de flebotominos en el cantón de Pérez Zeledón, así como el conocimiento de especies de *Leishmania* que se encuentran circulando en esta zona de Costa Rica.

Agradecimientos

A Dios, por ser el motor de fuerza que me acompañó durante cada momento, a mi virgencita por guiarme y darme su intercesión.

A mi familia, en especial a mis padres: Elizabeth y Mario, mi hermano Mario, mi abuelito Rafael, mi ángel Graciela y mi tío Rafael, gracias por cada oración y consejo que me brindaron.

A mi tutora, la M. Sc Silvia Argüello y mis asesoras, las Dras. Gaby Dolz y Ana Jiménez por brindarme su conocimiento, consejos, tiempo, recursos y el apoyo para llevar a cabo este trabajo.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por darme la oportunidad y los recursos para realizar mis estudios de maestría.

Al Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales (PCVET) por la oportunidad que me brindaron de investigar y darme las herramientas para llevarlo a cabo.

Al personal del laboratorio de Zoonosis por la ayuda brindada, en especial al Señor Sergio Alfaro por acompañarme en los trabajos de campo y brindarme su ayuda, su conocimiento y su tiempo durante toda esta investigación.

Al laboratorio de Parasitología del Instituto Costarricense de Investigaciones y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) por facilitar los controles para llevar a cabo este trabajo.

A las personas de las comunidades de Las Brisas y Concepción en Pérez Zeledón por las atenciones y la colaboración brindada.

A Sonia Flores, Evelyn Rodríguez, Brayan Montoya y María José Zúniga por ser mis compañeros, amigos y mi familia en Costa Rica, su amistad es uno de los grandes regalos que atesoraré siempre.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico a Dios por acompañarme y darme fuerza, a mi Virgencita por interceder por mi durante todo este proceso.

A mi familia por ser mi pilar, mi fuente de inspiración y motivación.

De manera muy especial quiero dedicar este trabajo a mi abuelita, mi amada Nana: Graciela. Eres el ángel que me cuida siempre y que vive conmigo en mi mente y en mi corazón, le doy gracias a Dios ser parte del legado que dejaste.

Índice

Resumen General	V
Agradecimientos	VI
Dedicatoria	VII
Lista de cuadros	X
Lista de figuras.....	XI
Introducción general	12
Bibliografía	16
ARTÍCULO 1:	20
1. Introducción	21
2. Materiales y métodos	22
2.1 Sitio de muestreo.....	22
2.2 Muestreo y recolección de flebotomos	23
2.3 Identificación de flebotomos.....	24
2.4 Análisis estadístico.....	24
2.4.1 Coeficiente de similitud de Jaccard	24
2.4.2 Riqueza específica (S).....	25
2.4.3 Índice de Shannon-Weaver (H)	25
2.4.4 Índice de Margalef (D_{Mg}).....	25
2.4.5 Índice de Pieluo (J)	25
3. Resultados	26
3.1 Identificación de especies de flebotomos.	26
3.2 Análisis estadístico.....	27
4. Discusión.....	27
5. Conclusiones	30
6. Recomendaciones	30
7. Bibliografía	31
ARTÍCULO II:.....	36
1. Introducción	38
2. Materiales y métodos	40
2.1 Sitio de muestreo.....	40
2.2 Muestreo y recolección de flebotomos	40

2.3 Identificación de flebótomos.....	41
2.4 Extracción de ADN.....	41
2.5 Detección molecular de <i>Leishmania</i> spp.	41
2.5.1 PCR en tiempo real para la detección de <i>Leishmania</i> spp.	41
2.5.2 PCR de tiempo final para la identificación de las especies de <i>Leishmania</i>	42
2.5.3 Secuenciación de <i>Leishmania</i> spp.	43
2.6 Determinación de fuentes alimenticias	43
3. Resultados	44
3.3.1 Infección natural por <i>Leishmania</i> spp en flebotominos hembras recolectados en el distrito Daniel Flores de Pérez Zeledón.	44
3.3.2 Identificación de especies de <i>Leishmania</i>	47
3.3.3 Determinación de fuentes alimenticias en hembras con sangre de las localidades Las Brisas y Daniel Flores.....	48
4. Discusión.....	50
5. Conclusiones	56
6. Recomendaciones	56
7. Bibliografía	57
Discusión General.....	63
Conclusiones Generales	68
Recomendaciones Generales	69
Anexos.....	70

Lista de cuadros

Artículo I

Cuadro 1: Especies de flebótomos según sexo y localidad muestreada. 26

Cuadro 2: Índices ecológicos de diversidad estimados en las localidades muestreadas. 27

Artículo II

Cuadro 1: Distribución de grupos de flebotominos y hembras con sangre analizados por localidad (Las Brisas y Concepción) y especies de *Lutzomyia*. 44

Cuadro 2: Detección de *Leishmania* spp mediante qPCR en grupos y en hembras ingurgitadas de flebotominos recolectados en las localidades de Las Brisas y Concepción de Daniel Flores. 46

Cuadro 3: Resultados de secuenciación en muestras positivas en qPCR-*Leishmania* spp. 48

Cuadro 4: Resultados de PCR de ingesta alimenticia en hembras con sangre según la especie y localidad. 50

Lista de figuras

Artículo I

Figura 1: Localidades muestreadas en el distrito Daniel Flores en Pérez Zeledón 23

Artículo II

Figura 1: Curva de amplificación del kDNA de las muestras positivas mediante la técnica de qPCR-*Leishmania* spp. 45

Figura 2: Curva de amplificación del kDNA de muestra positiva mediante la técnica de qPCR-*Leishmania* spp. 46

Figura 3: Productos de amplificación de una región aproximadamente de 330 pb de ITS-1 de *Leishmania* spp. mediante la técnica de PCR visualizados en un gel de agarosa al 1%.. 47

Figura 4: Amplificación de un fragmento de aproximadamente 169 pb de la región ITS de aves.. 48

Figura 5: Amplificación de un fragmento de aproximadamente 623 pb del gen Cyt b de mamíferos. 49

Figura 6: Amplificación de un fragmento de aproximadamente 200 pb de la región de ITS de humanos. 49

Anexos

Figura 1: 70

Figura 2: 70

Figura 3: 70

Figura 4: 71

Figura 5: 71

Figura 6: 71

Figura 7: 72

Figura 8: 72

Figura 9: 72

Figura 10: 73

Figura 12: 73

Figura 13: 74

Figura 14: 74

Figura 15: 74

Introducción general

La leishmaniasis es considerada como una enfermedad desatendida de importancia zoonótica, que afecta diferentes poblaciones, tanto animales como humanas en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo (OPS, 2019a). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la enfermedad es endémica en 88 países de cuatro continentes: América, África, Asia y Europa, estimando a nivel mundial una incidencia anual de leishmaniasis cutánea entre 600,000 a un millón de casos y leishmaniasis visceral entre 50,000 a 90,000 casos (Sasidharan & Saudagar, 2021; Taghipour et al., 2021). En América, la enfermedad se ha reportado en 18 países, siendo la leishmaniasis cutánea (LC) la forma clínica más común y la leishmaniasis visceral (LV) la forma más severa. (OPS, 2019a).

La enfermedad es causada por un protozoo intracelular perteneciente al género *Leishmania*, que comprende alrededor de 22 especies patógenas agrupadas en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* (OPS, 2019b). Este grupo de enfermedades se caracteriza por presentar diferentes manifestaciones clínicas de acuerdo con la especie de *Leishmania* que se encuentre parasitando (Llanos-Cuenta., 2013; Mejía et al., 2018; Taslimi et al., 2018; OPS, 2019a).

En Costa Rica, la leishmaniasis se presenta en diferentes formas clínicas: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC), leishmaniasis cutánea atípica (LCA) y leishmaniasis visceral (LV). El primer caso reportado en el país de LC fue en 1924 (Jaramillo-Antillón et al., 2018). En 1998, estudios realizados por Peraza, Urbina y Zeledón, mediante estudios de electroforesis de isoenzimas y de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales, lograron aislar diferentes especies de *Leishmania* en 34 pacientes con LC. En 32 pacientes procedentes de los cantones de Acosta y Pérez Zeledón en la provincia de San José; San Ramón, San Carlos y Los Chiles en la provincia de Alajuela; Buenos Aires y Puerto Jiménez en la provincia de Puntarenas; Guácimo, Cariari, Guápiles, Siquirres, Pocora, Talamanca, Sixaola y el cantón central, en la provincia de Limón; Sarapiquí en la provincia de Heredia, y Turrialba en la provincia de Cartago se identificó la presencia de *Leishmania panamensis*, mientras que en dos pacientes procedentes de Pérez Zeledón y Guápiles se identificó *Leishmania braziliensis* (Peraza et al., 1998; Jaramillo et al., 2018). Debido a estos hallazgos, se concluyó que *L. panamensis* es el principal agente etiológico de la LC, mientras que *L. braziliensis* es considerado el principal causante de

LMC. En 1989 se reportaron los primeros casos de LCA causada por *Leishmania infantum/chagasi* en zonas semiáridas de Guanacaste, diez años después se reportó el primer caso de LV en Costa Rica causada por *Leishmania donovani/infantum/chagasi* (Jaramillo-Antillón et al., 2018).

De acuerdo con reportes de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), durante el 2019 se reportaron 601 casos de leishmaniasis cutánea en Costa Rica con una incidencia de 11,33/ 100.000 habitantes siendo *Lutzomyia trapidoi* y *Lutzomyia ylephiletor* los agentes principales en la transmisión de la enfermedad (OPS, 2020).

En el 2020 mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) asociada a polimorfismos en longitud de fragmentos de restricción (RFLP) se analizaron 72 aislamientos de *Leishmania* spp. de un banco de muestras del Centro Nacional de Referencia en Parasitología (CNRP) del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), los aislamientos se obtuvieron a partir de muestras de lesiones cutáneas de personas con diagnóstico parasitológico de LC provenientes de diferentes zonas endémicas de leishmaniasis en el país. Los análisis identificaron la presencia de *Leishmania panamensis*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania guyanensis*, siendo el primer reporte de *L. guyanensis* en Costa Rica (Campos-Fuentes et al., 2020). Esta especie se ha reportado principalmente en Brasil, Guyana, Guyana Francesa, Perú, Suriname, Bolivia, Colombia y Venezuela causando cuadros clínicos de LC. El principal vector de *L. guyanensis* es *Lutzomyia umbratilis*, reportado principalmente en países de América del Sur (de Souza Freitas et al., 2015), otro vector incriminado es *Lutzomyia anduzei*, esta especie se distribuye principalmente en países norte de América del Sur como Brasil, Guyana Francesa y Venezuela, sin embargo, también se ha reportado en países de América Central como Panamá y en Costa Rica en la provincia de Alajuela (Scarpassa et al., 2015).

Muchos de los casos de leishmaniasis son consideradas como zoonosis, por lo que los reservorios primarios son usualmente mamíferos silvestres que no suelen mostrar signos evidentes de la infección y la presencia de amastigotes en piel o vísceras es escasa. En América los reservorios silvestres o salvajes identificados incluyen a marsupiales como la zarigüeya (*Didelphis* spp.), oso perezoso, oso hormiguero menor, zorro y algunos roedores (*Rattus* spp., *Proechimys* spp., *Nectomys* spp., *Oryzomys* spp.). Generalmente hay un reservorio principal para cada especie de *Leishmania*, pero otros mamíferos de la misma zona pueden resultar también infectados y

convertirse en huéspedes secundarios que albergarán al parásito. Los mamíferos domésticos con frecuencia son reservorios secundarios o accidentales, el más importante es el perro, el cual es reservorio de *L. infantum/chagasi* (OMS, 2010; Llanos-Cuenta, 2013; Becker et al., 2014; OPS, 2019b).

En Costa Rica se ha reportado que los osos perezosos *Bradypus variegatus* (perezoso de tres dedos) y *Choloepus hoffmani* (perezoso de dos dedos) son los principales reservorios de *Leishmania panamensis* (Peraza et al., 1998; Jaramillo et al., 2018). Ambas especies de perezosos pueden habitar en zonas altas o bajas con mucha humedad, sin embargo, se ha reportado que *B. variegatus* se encuentra habitando en mayor cantidad las zonas bajas y húmedas del país específicamente la zona del Caribe y el sur del Pacífico mientras que *C. hoffmani* se encuentra en más abundancia en las zonas más altas y húmedas del país. No hay reportes en los cuales se describa a estos animales habitando las partes con estación seca pronunciada como el noroeste del país incluyendo la península de Nicoya. Otros reservorios importantes de leishmaniasis en el país incluyen al ratón silvestre *Heteromys desmarestianus*, en el cual se ha aislado *L. panamensis* y los perros como reservorios de LV y LCA (Jaramillo et al., 2018).

Aunque los reservorios no presentan manifestaciones clínicas pueden existir de una manera leve, en el caso del perro, puede morir de la infección (leishmaniasis canina). En el perro los parásitos son abundantes en las vísceras y en la dermis, donde los vectores pueden captar fácilmente los amastigotes (Alvar Ezquerro, 2001; OMS, 2010).

En cuanto al vector, en el continente americano, la leishmaniasis es transmitida por hembras del género *Lutzomyia* (Brazil et al., 2015; Kelly et al., 2017; OPS, 2019a). En el Neotrópico se reportan cerca de 500 especies y al menos 30 de ellas han sido descritas como vectores del parásito (Mejía et al., 2018). Costa Rica es un país con abundantes zonas boscosas húmedas en las cuales la población de flebótomos es abundante, se han identificado 62 especies y dos han sido incriminados como vectores en la transmisión de leishmaniasis. Zeledón y colaboradores (1973) aislaron por primera vez parásitos del complejo *Leishmania braziliensis panamensis* en especímenes de *Lutzomyia ylephiletor* en Palmar sur, en la región del Pacífico y posteriormente en 1977 se aisló nuevamente en *Lutzomyia trapidoi* y *Lutzomyia ylephiletor* en la vertiente atlántica (Murillo & Zeledón., 1985). En estudios posteriores se aisló *Leishmania panamensis* en dos especímenes de

Lu. ylephiletor y en uno de *Lu. trapidoi* (Murillo & Zeledón., 1985; Jaramillo et al., 2018; Rojas Madriz, 2019). Debido a estos hallazgos, se incriminó a *Lu. ylephiletor* y *Lu. trapidoi* como los principales transmisores de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Costa Rica (Murillo & Zeledón., 1985; Zeledón et al., 1985; Jaramillo et al., 2018). Sin embargo, otras 17 especies también han sido identificadas como antropofílicas, lo que representa un riesgo epidemiológico por su potencial vectorial (Murillo & Zeledón., 1985).

En la zona de Pacífico norte, la cual es una zona árida y que comprende la región costera de la provincia de Guanacaste y parte de la provincia de Puntarenas, se han podido encontrar poblaciones de flebotomos como *Lutzomyia longipalpis*, vector asociado con la transmisión de LV y LCA (Murillo & Zeledón., 1985). Otra especie que se ha encontrado en las mismas zonas semiáridas, pero en una proporción inferior es *Lutzomyia evansi* (Zeledón et al., 1984; Murillo & Zeledón., 1985; Jaramillo et al., 2018). En estudios realizados en localidades de Liberia se han encontrado poblaciones de *Lu. longipalpis*, *Lu. evansi*, *Lu. cayennensis* y *Lu. chiapanensis* en letrinas peridomiciliares (Herrero et al., 1991; Argüello Vargas, 2006).

En la zona del Pacífico sur, la cual es una región muy lluviosa, se ha reportado que la presencia de flebotomos es abundante y se han encontrado poblaciones de *Lutzomyia ylephiletor*, *Lutzomyia trapidoi*, *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia shannoni*, *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia cruciata*, *Lutzomyia vespertilionis*, entre otras especies (Murillo & Zeledón., 1985).

En el Caribe, un estudio realizado en La Villa de Amubri, cantón de Talamanca, provincia de Limón, se reportó la presencia de *Lu. panamensis*, *Lu. gomezi*, *Lu. ylephiletor*, *Lu. cruciata*, *Lu. geniculata*, *Lu. barrettoii majuscula* y *Lu. serrana* (Sosa-Ochoa, 2010).

Debido a que los cambios en los factores climáticos y los cambios del paisaje producidos por la deforestación y urbanización pueden generar cambios temporales y espaciales en la entomofauna, es imprescindible llevar a cabo estudios sobre la composición de especies de flebotominos, realizar pruebas que permitan detectar su infección natural con *Leishmania* y conocer sus fuentes alimenticias, entre otros factores de su ecología para la evaluación e implementación de medidas de control vectorial.

El propósito de esta investigación fue determinar las especies de flebótomos que se encuentran en dos localidades del distrito Daniel Flores en Pérez Zeledón, detectar infección natural de *Leishmania* spp. y determinar las fuentes alimenticias.

Bibliografía

Alvar Ezquerro, J.P. (2001). *Las leishmaniasis: de la biología al control*. (2ª edición). Intervet S.A.

Argüello Vargas, S. (2006). Caracterización del hábitat y distribución de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) en sitios con historia previa de leishmaniasis cutánea atípica en Liberia (Guanacaste, Costa Rica) [Tesis de grado, Universidad Nacional de Costa Rica]. <http://repositorio.conicit.go.cr:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/206/Silvia%20Arguello%20Vargas.pdf?sequence=6&isAllowed=y>

Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Kobe, L.G., & Hernández-Ruiz, J. (2014). Capítulo 9: Leishmaniasis. En Becerril Flores, M. A. (Ed), *Parasitología médica* (4ta edición, pp. 85-93), McGraw-Hill/Interamericana.

Brazil, R. P., Rodrigues, A. A. F., & Andrade Filho, J. D. (2015). Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas—a mini review. *Entomology, Ornithology & Herpetology*, 4(2), 1-4. <https://doi.org/10.4172/2161-0983.1000144>

Campos-Fuentes, E., Castro-Castillo, A., Calvo-Fonseca, N., Mata-Somarribas, C., Prado-Porras, M. (2020). Molecular identification of species causing cutaneous *Leishmaniasis* of five endemic areas of Costa Rica through PCR-RFLP technique of the Hsp70 gene. *Revista Parasitología Latinoamericana*, 69 (2): 7-12. <https://sociedadchilenaparasitologia.cl/wp-content/uploads/2020/12/69-2-a%C3%B1o-2020-con-editorial.pdf>

de Souza Freitas, M. T., Ríos-Velasquez, C. M., Costa, C. R. L., Figueirêdo, C. A. S., Aragão, N. C., da Silva, L. G., ... & de Queiroz Balbino, V. (2015). Phenotypic and genotypic variations among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of

Leishmania guyanensis. *Parasites & Vectors*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1051-7>

Herrero, M. V., Urbina, A., Gutiérrez, H., Jiménez, A., Pereira, R., & Rivera, C. (1991). Peridomestic latrines and Phlebotominae sandflies (Diptera: Psychodidae) in a focus of Leishmaniasis in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 155-157. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/24842/25056>

Jaramillo-Antillón, O., Espinoza-Aguirre, A., & Lobo-Philp, R. (2009). Estado actual de la leishmaniosis en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 51(3), 158-164. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/amc/v51n3/a07v51n3.pdf>

Jaramillo-Antillón, O., Espinoza-Aguirre, A., Calvo-Fonseca, N., Mata-Somarribas, C., & Wasserman, H. (2018). Cutaneous leishmaniasis in Costa Rica: prevention, diagnosis and treatment. *Acta Médica Costarricense*, 60(3), 103-114. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/amc/v60n3/0001-6002-amc-60-03-103.pdf>

Kelly, P. H., Bahr, S. M., Serafim, T. D., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., Meneses, C., & Wilson, M. E. (2017). The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. *MBio*, 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.01121-16>.

Llanos-Cuenta, A. (2013). Capítulo 42: Leishmaniasis. En Apt-Baruch, W. (Ed). *Parasitología humana* (pp. 298-309). McGraw-Hill/Interamericana.

Mejía, Á., Matamoros, G., Fontecha, G., & Sosa-Ochoa, W. (2018). Bionomic aspects of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis*, proven vectors of *Leishmania infantum* in an endemic area of non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras. *Parasites & vectors*, 11(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2605-7>

Murillo, J., & Zeledón, R. (1985). Brenesia. *Revista de ciencias Naturales del Museo Nacional de Costa Rica*, 1(23), 1-144

- Organización mundial de la Salud [OMS]. (2010). *Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010. Serie de informes técnicos*. OMS. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/82766/WHO_TRS_949_spa.pdf%3Bsequence=1&isAllowed=y
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2019a). *Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas*. Washington, D.C: OPS. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2019b). *Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas*. Washington, D.C: OPS. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2020). *Leishmaniasis: Informe Epidemiológico de las Américas*. Washington, D.C.: OPS/OMS. http://www.panaftosa.org/leish/inf2019_es/INFO_CRI_2019_ESP.pdf
- Peraza, J., Urbina, A., & Zeledón, R. (1998). Zymodeme and serodeme characterization of *Leishmania* isolates obtained from Costa Rican patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(3), 283-287. <https://www.scielo.br/j/mioc/a/hNMvrdZWWBbJQGBKGJp5QhC/?format=pdf&lang=en>
- Rojas Madriz, B. (2019). Leishmaniasis cutánea: una revisión centrada en Costa Rica. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(2), 82-94. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/mlcr/v36n2/2215-5287-mlcr-36-02-82.pdf>
- Scarpassa, V. M., da Silva Figueiredo, A., & Alencar, R. B. (2015). Genetic diversity and population structure in the *Leishmania guyanensis* vector *Lutzomyia anduzei* (Diptera,

- Psychodidae) from the Brazilian Amazon. *Infection, Genetics and Evolution*, 31, 312-320. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.02.007>
- Sasidharan, S., & Saudagar, P. (2021). Leishmaniasis: where are we and where are we heading?. *Parasitology Research*, 120(5), 1541-1554. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07139-2>.
- Sosa-Ochoa, W. H. (2010). Distribución espacial de los casos notificados como leishmaniasis e identificación de las especies de *Lutzomyia* (Díptera: Psychodidae) infectadas naturalmente en el cantón de Talamanca, Costa Rica [Tesis de posgrado, Universidad Nacional de Costa Rica]. https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/20115/Tesis%20Maestria_Wilfredo%20Sosa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Taghipour, A., Abdoli, A., Ramezani, A., Abolghazi, A., Mofazzal Jahromi, M. A., Maani, S., ... & Ghasemi, E. (2021). Leishmaniasis and trace element alterations: a systematic review. *Biological Trace Element Research*, 199(10), 3918-3938. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02505-0>
- Taslimi, Y., Zahedifard, F., & Rafati, S. (2018). Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology*, 145 (4), 1-11. <https://doi.org/10.1017/S003118201600216X>
- Zeledón, R., Murillo, J., & Gutierrez, H. (1984). Observaciones sobre la ecología de *Lutzomyia longipalpis* (lutz & Neiva, 1912) y posibilidades de existencia de leishmaniasis visceral en Costa Rica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79(4), 455-459. <https://www.scielo.br/j/mioc/a/gJdjwwj4kmdzjjxd9wH8Jdg/?format=pdf&lang=es>
- Zeledón, R., Murillo, J., & Gutiérrez, H. (1985). Flebótomos antropófilos y leishmaniasis cutánea en Costa Rica. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*; 99 (2). <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/16769/v99n2p163.pdf?sequence=1>

ARTÍCULO 1:

Identificación de especies de flebotominos (Diptera: Psychodidae) en dos localidades endémicas de leishmaniasis del distrito Daniel Flores en el cantón de Pérez Zeledón.

Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad tropical transmitida de manera vectorial por dípteros conocidos como flebótomos. Actualmente se han reportado 62 especies de flebotominos en Costa Rica, 19 de ellas presentan hábitos antropofílicos, siendo *Lutzomyia ylephiletor* y *Lutzomyia trapidoi* las especies incriminadas como vectores de *Leishmania panamensis* y *Leishmania braziliensis*, causantes de leishmaniasis cutánea y mucocutánea respectivamente en Costa Rica. En el 2020 se reportó por primera vez la presencia de *Leishmania guyanensis* en casos autóctonos en el país, sin embargo, no se conoce la especie de *Lutzomyia* involucrada en su transmisión, debido a ello el objetivo de este estudio fue determinar las especies de flebótomos en dos localidades endémicas de leishmaniasis del distrito Daniel Flores en Pérez Zeledón, donde se presentaron los casos por *L. guyanensis*. Los muestreos se llevaron a cabo en las localidades de Las Brisas y Concepción, del distrito Daniel Flores, en el cantón de Pérez Zeledón. Se colocaron 6 trampas luminosas tipo CDC en ambas localidades por 3 noches consecutivas, de 6 pm a 6 am. Los flebótomos recolectados se identificaron de acuerdo con las características morfológicas del cibario y la genitalia según Young y Duncan (1994). Se identificaron 15 especies de flebotominos de los cuales 11 especies son consideradas antropofílicas y 9 de importancia epidemiológica. Las especies de *Lu. triramula*, *Lu. cruciata* y *Lu. serrana* fueron las más abundantes en este trabajo. La localidad de Concepción presentó mayor cantidad de especies en comparación con Las Brisas.

Palabras clave

Leishmaniasis, *Lutzomyia ylephiletor*, *Lutzomyia trapidoi*, *Lutzomyia cruciata*, *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia ovallesi*, *Lutzomyia triramula*.

Abstract

Leishmaniasis is a vector-borne tropical disease by dipterans known as sandflies. Currently 62 species of sandflies have been reported in Costa Rica, 19 of them present anthropophilic habits, being *Lutzomyia ylephiletor* and *Lutzomyia trapidoi* the species incriminated as vectors of *Leishmania panamensis* and *Leishmania braziliensis* causing cutaneous and mucocutaneous

leishmaniasis in Costa Rica. In 2020, the presence of *Leishmania guyanensis* was reported for the first time in autochthonous cases in the country, however, the species of *Lutzomyia* involved in its transmission is not known, due to this the objective of this study was to determine the species of sandflies in two endemic localities of leishmaniasis in the Daniel Flores district in Pérez Zeledón, where the cases due to *L. guyanensis* occurred. Sampling was carried out in the towns of Las Brisas and Concepción, in the Daniel Flores district, in the canton of Pérez Zeledón. 6 CDC-type light traps were placed in both locations for 3 consecutive nights, from 6 pm to 6 am. The collected sandflies were identified according to the morphological characteristics of the cibarium and genitalia according to Young and Duncan (1994). Fifteen species of sandflies were identified, of which 11 species are considered anthropophilic and 9 of epidemiological importance. The species of *Lu. triramula*, *Lu. cruciata* and *Lu. serrana* were the most abundant in this work. The town of Concepción presented a greater number of species compared to Las Brisas.

Keywords

Leishmaniasis, *Lutzomyia ylephiletor*, *Lutzomyia trapidoi*, *Lutzomyia cruciata*, *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia ovallesi*, *Lutzomyia triramula*.

1. Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad transmitida por pequeños dípteros hematófagos pertenecientes a la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae. Los flebótomos viven en ambientes muy variables, tienen un espectro ecológico entre desiertos y bosques tropicales. Los vectores que viven en bosques tropicales requieren hábitats ecológicos con un alto grado de humedad atmosférica y temperaturas frescas, generalmente lugares en regiones por debajo de los 1.700 m.s.n.m (Botero & Restrepo, 2012).

En el continente americano, la leishmaniasis es transmitida por hembras del género *Lutzomyia* (Brazil et al., 2015; Kelly et al., 2017; OPS, 2019) exhibiendo una amplia área de distribución, que va desde las áreas sur de la región Neártica hasta la zona neotrópica (Brazil et al., 2015; Akhoundi et al., 2016; Mejía et al., 2018). Solo en el neotrópico se reportan cerca de 500 especies de *Lutzomyia* y al menos 30 de ellas han sido descritas como vectores del parásito (Mejía et al., 2018).

En Costa Rica se han reportado 62 especies de flebótomos, de las cuales 19 especies son consideradas antropofílicas (Murillo & Zeledón., 1985; Sosa-Ochoa, 2010). Hay cinco especies

que predominan en áreas endémicas: *Lutzomyia ylephiletor*, *Lutzomyia sanguinaria*, *Lutzomyia geniculata*, *Lutzomyia evansi* y *Lutzomyia panamensis*. Sin embargo, también se encuentran otras especies que siguen en frecuencia como lo son *Lutzomyia traidoi*, *Lutzomyia shannoni* y *Lutzomyia gomezi* (Murillo & Zeledón., 1985). De todas estas especies, *Lu. ylephiletor* es considerada como el vector principal en la transmisión de *Leishmania* spp. en las zonas endémicas de Costa Rica. Sin embargo, las otras especies consideradas como vectores de la enfermedad también representan un riesgo epidemiológico (Jaramillo et al., 2018). Murillo y Zeledón en 1985, reportaron en el cantón de Pérez Zeledón la presencia de flebótomos como *Lutzomyia ylephiletor*, *Lutzomyia shannoni*, *Lutzomyia edentula* y *Lutzomyia triramula*, de las cuales únicamente las dos primeras son antropofílicas (Murillo & Zeledón., 1985).

Desde el año 2000 no hay estudios publicados en el país que informen sobre las especies de flebótomos que se encuentran en las zonas endémicas de leishmaniasis, por lo que se hace relevante actualizar la información de las especies presentes ya que, factores como el clima, cambios atmosféricos, deforestaciones y actividades antropozonóticas pueden modificar la composición de la entomofauna, incluidos los flebótomos. Específicamente en Pérez Zeledón, no se han publicado investigaciones desde las reportadas por Murillo & Zeledón en 1985.

El objetivo de esta investigación fue determinar las especies de flebótomos en dos localidades endémicas de leishmaniasis en el distrito Daniel Flores, Pérez Zeledón.

2. Materiales y métodos

2.1 Sitio de muestreo

El estudio se llevó a cabo en dos localidades del distrito Daniel Flores en el cantón de Pérez Zeledón, en la provincia de San José. Este distrito se encuentra a una altura media de 639 m.s.n.m, su clima es húmedo, mayoritariamente nublado con presencia de lluvias generalmente durante todo el año, con una temperatura media que varía entre 21°C a 30°C y una precipitación de 479 mm al año, con una población de 33,537 habitantes para el 2011 de acuerdo con el último censo del INEC.

Las localidades muestreadas fueron Las Brisas (coordenadas 9.3643851 N, -83.6880947 O) y Concepción (coordenadas 9.234303 N, -83.6664676 O) (Figura 1). Ambas localidades presentan abundantes zonas boscosas con sitios de cultivo como café, caña de azúcar, granos básicos, entre

otros, en viviendas de ambas localidades se encontró la presencia de animales en los peridomicilios como aves de corral, vacas, cabras, ovejas, caballos, perros y gatos, entre otros. La localidad de Concepción presentó mayores extensiones boscosas, presentando entornos más rurales y más zonas de cultivo, mientras que la localidad de Las Brisas presentó un entorno más urbanizado y con zonas más deforestadas.

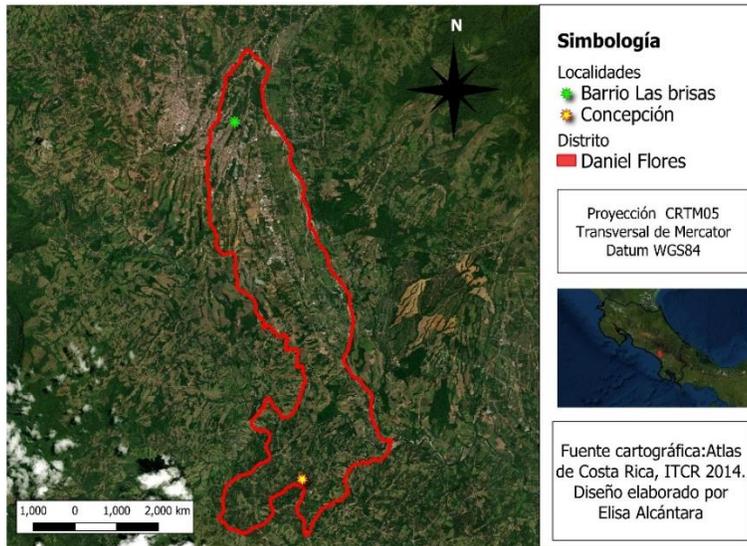


Figura 1: Localidades muestreadas en el distrito Daniel Flores en Pérez Zeledón

La elección de las localidades fue determinada por el hallazgo de *Leishmania guyanensis* en dos muestras de lesiones cutáneas, siendo este hallazgo el primer reporte de esta especie en el país. Las muestras pertenecían a dos casos autóctonos procedentes de Concepción y Las Brisas (Campos Fuentes et al., 2020; Campos Fuentes, 2021)

2.2 Muestreo y recolección de flebótomos

Se realizaron cuatro muestreos por 3 noches consecutivas durante el periodo de abril a agosto del 2021. Se colocaron seis trampas luminosas tipo CDC en cada localidad a una altura de aproximadamente 1 metro sobre el suelo en zonas peridomiciliares y boscosas, con abundante vegetación y cerca de sitios de reposo de animales durante toda la noche a partir de las 18:00 horas hasta las 6:00 horas del día siguiente.

Los especímenes capturados fueron transportados en frascos con alcohol al 70% debidamente rotulados para su almacenamiento, hasta su montaje e identificación taxonómica. Posteriormente las muestras se llevaron al Laboratorio de Entomología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

2.3 Identificación de flebótomos

En el laboratorio, los insectos identificados como flebótomos se separaron del resto de los insectos colectados, basándose en el tamaño, color, patas largas y alas. Las muestras conservadas en alcohol se hidrataron en PBS 1X durante 30 min, luego se aclararon con KOH al 10% durante 3 horas y se lavaron en PBS 1X durante 5 min. Posteriormente, los especímenes fueron montados en un portaobjetos para la disección de la cabeza. Luego de la disección, se agregó medio de Hoyer para fijar las piezas y realizar la identificación establecida por Young y Duncan en base a la genitalia y el cibario (Young & Duncan, 1994).

2.4 Análisis estadístico

Para realizar comparaciones de la diversidad de especies entre las dos localidades muestreadas se estimó el coeficiente de similitud de Jaccard y para analizar la diversidad de los flebótomos recolectados por localidad se estimó la riqueza específica y los índices de Shannon-Weaver, Margalef y Pielou.

Similitud entre comunidades

2.4.1 Coeficiente de similitud de Jaccard

Este índice mide las diferencias en relación a la presencia o ausencia de especies encontradas. El intervalo de valores oscila entre 0 cuando no hay especies compartidas entre ambos lugares, hasta 1 cuando los dos lugares comparten las mismas especies. Se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$I_j = c/a + b - c$$

Donde:

a: número de especies en el sitio A (Las Brisas)

b: número de especies en el sitio B (Concepción)

c: número de especies presentes en ambos lugares (A y B)

Índices para calcular diversidad

2.4.2 Riqueza específica (S)

Para calcular la riqueza específica (S) se basa únicamente en el número de especies encontradas

2.4.3 Índice de Shannon-Weaver (H)

Con este índice se contempla la cantidad de especies presentes en el área de estudio (riqueza) y la cantidad relativa de individuos de cada una de las especies (abundancia). Los valores oscilan entre 0 cuando hay una sola especie y al logaritmo de riqueza específica (S) cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos. Se utiliza la siguiente fórmula:

$$H = - \sum (Pi)(\ln Pi)$$

Donde:

Pi: proporción de individuos de la especie respecto al total de individuos (abundancia relativa de la especie)

ln Pi: logaritmo natural de pi

2.4.4 Índice de Margalef (D_{Mg})

Este índice supone que hay una relación funcional entre el número de especies y el número total de individuos. Los valores oscilan entre 0 cuando existe solo una especie en la muestra hasta 5 cuando hay un número relativamente grande de especies. Se utiliza la siguiente fórmula:

$$D_{Mg} = S - 1 / \ln (N)$$

Donde:

S: riqueza de especies (número de especies presentes)

N: número total de individuos encontrados

2.4.5 Índice de Pielou (J)

Mediante este índice se determina si la abundancia de individuos por especie es semejante y su equitatividad. Mide la proporción de diversidad observada con relación a la máxima diversidad esperada. Su valor oscila de 0 a 1, de manera que 0 representa la ausencia de uniformidad y 1 corresponde a situaciones donde todas las especies son igualmente abundantes. Se utiliza la siguiente fórmula:

J' : $H'/H'max$

Donde:

$H'max$: $\ln(S)$

H' : índice de Shannon-Weaver

S: número total de especies presentes.

3. Resultados

3.1 Identificación de especies de flebótomos.

Se recolectaron 282 especímenes de flebótomos, identificando 15 especies en total, de las cuales 11 son consideradas antropofílicas. Del total de especímenes recolectados, 162 eran hembras (57.4%) y 120 machos (42.6%). Las especies que se recolectaron con mayor predominancia fueron *Lutzomyia triramula* (48.2%), *Lutzomyia cruciata* (19.1%) y *Lutzomyia serrana* (7.8%). En el cuadro 1 se resume la distribución de especies en total. En la localidad de Las Brisas se recolectaron 130 individuos (46%) mientras que en Concepción se identificaron 152 (54%). Ambas localidades presentaron 8 especies en común, siendo *Lu. triramula*, *Lu. cruciata*, *Lu. serrana*, *Lu. panamensis*, *Lu. ylephiletor*, *Lu. youngi*, *Lu. trapidoi* y *Brumptomyia* sp. las especies que se encontraron en común en ambas localidades. En la localidad de Las Brisas la especie que se encontró en mayor cantidad fue *Lu. triramula* (109 individuos) mientras que en Concepción se observó una predominancia de *Lu. cruciata* (51 individuos).

Cuadro 1: Especies de flebótomos según sexo y localidad muestreada.

Especie	Las Brisas			Concepción			TOTAL n (%)
	Machos	Hembras	Total	Machos	Hembras	Total	
<i>Lutzomyia triramula</i>	46	63	109	8	19	27	136 (48.2)
<i>Lutzomyia cruciata</i> *	1	2	3	36	15	51	54 (19.1)
<i>Lutzomyia serrana</i> *	1	0	1	15	6	21	22 (7.8)
<i>Lutzomyia ylephiletor</i> *	4	3	7	5	4	9	16 (5.7)
<i>Lutzomyia panamensis</i> *	0	5	5	0	8	8	13 (4.6)
<i>Lutzomyia youngi</i> *	0	1	1	0	8	8	9 (3.2)
<i>Lutzomyia runoides</i>	0	0	0	1	5	6	6 (2.1)
<i>Lutzomyia geniculata</i> *	0	0	0	0	6	6	6 (2.1)
<i>Lutzomyia carrerai thula</i> *	0	0	0	3	2	5	5 (1.8)
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	1	1	0	3	3	4 (1.4)
<i>Lutzomyia trapidoi</i> *	0	2	2	0	2	2	4 (1.4)
<i>Lutzomyia ovallesi</i> *	0	0	0	0	3	3	3 (1.1)

<i>Lutzomyia sanguinaria</i> *	0	0	0	0	2	2	2 (0.7)
<i>Lutzomyia sordellii</i>	0	1	1	0	0	0	1 (0.4)
<i>Lutzomyia barrettoii majuscula</i> *	0	0	0	0	1	1	1 (0.4)
TOTAL	52	78	130	68	84	152	282 (100)

* Especies antropofílicas

3.2 Análisis estadístico

En relación con la similitud entre las dos localidades muestreadas, se obtuvo un coeficiente de Jaccard (I_j) de 0.53 ya que, de las 15 especies encontradas 8 estaban presentes en ambas localidades.

En el cuadro 2 se resumen los valores obtenidos para los índices de diversidad en cada localidad. Concepción fue la localidad que presentó mayor riqueza, diversidad y equitatividad, ya que se identificaron 14 especies, los índices de Shannon-Weaver, Margalef y Pieluo fueron mayores en comparación con Las Brisas en donde se encontraron 9 especies, los índices en esta localidad tuvieron valores bajos cercanos a cero, lo cual indica que la diversidad de especies en esa localidad es baja.

Cuadro 2: Índices ecológicos de diversidad estimados en las localidades muestreadas.

Índices de diversidad	Las Brisas	Concepción
Riqueza específica (S)	9	14
Índice de Shannon-Weaver (H)	0.73	2.06
Índice de Margalef (D_{Mg})	1.64	2.59
Índice de Pieluo (J)	0.33	0.78

4. Discusión

La investigación reporta 13 especies más que las reportadas por Murillo y Zeledón (1985) en Pérez Zeledón, esta información es de relevancia epidemiológica ya que 11 de las especies identificadas son antropofílicas, entre ellas, *Lu. ylephiletor* (5.7%) y *Lu. trapidoi* (1.4%), las cuales han sido descritas como vectores principales de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania panamensis* en Costa Rica (Murillo & Zeledón., 1985; Zeledón et al., 1985). Las especies de *Lu. panamensis* (4.6%), *Lu. ovallesi* (1.1%), y *Lu. cruciata* (19.1%) han sido descritas como vectores involucrados en la

transmisión de leishmaniasis cutánea en otros países. *Lu. panamensis* es descrita como uno de los principales transmisores de *Leishmania panamensis* en Panamá y otros países del sur de América (OPS, 2019; Dutari & Loaiza, 2014). *Lu. ovallesi* se ha confirmado como vector de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana* en países como Guatemala, Colombia y Venezuela (Vargas & Úsuga, 2022; OPS, 2019; Sandoval et al., 1998; 2006), mientras que *Lu. cruciata* ha sido reportada como transmisora de *Leishmania mexicana* en México (OPS, 2019; Pech-May et al., 2013), *Lu. youngi* (3.2%) ha sido reportada como transmisora de *L. braziliensis* en Venezuela y Colombia (Torrellas et al., 2018; Testa et al., 2002) y de *L. mexicana* en Venezuela (Blanco et al., 2018).

Otras especies antropofílicas identificadas en este trabajo y que son reconocidas como potenciales vectores en la transmisión de leishmaniasis cutánea fueron *Lu. serrana* (7.8%), la cual es sospechosa de transmitir *L. braziliensis* en Ecuador y Colombia (Hoyos-López et al., 2016; Santamaría et al., 2002), *Lu. carrerai-thula* (1.8%) y *Lu. sanguinaria* (0.7%) sospechosas de transmitir *L. panamensis* en países como Panamá (Dutari & Loaiza, 2014).

En este estudio se identificaron las especies *Lu. ylephiletor* y *Lu. triramula*, que coincide con lo reportado por Murillo y Zeledón (1985). La especie que presentó mayor abundancia fue *Lu. triramula* (48.2%); esta especie no es considerada antropofílica ni reporta importancia médica hasta el momento, sin embargo, es altamente fototrópica, lo cual puede explicar que se haya capturado en mayor proporción en este trabajo (Martínez et al., 2019).

Ambas localidades presentan abundantes zonas boscosas que favorecen la presencia de flebótomos; sin embargo, Concepción es una localidad con un entorno más rural, con menos urbanización y con zonas más reforestadas que Las Brisas, lo que puede favorecer una mayor diversidad de flebótomos en esa localidad. En este estudio, Concepción presentó mayor equidad y riqueza de especies, identificándose 14, de las cuales 9 son epidemiológicamente importantes: *Lu. cruciata*, *Lu. serrana*, *Lu. panamensis*, *Lu. ylephiletor*, *Lu. youngi*, *Lu. carrerai-thula*, *Lu. ovallesi*, *Lu. trapidoi* y *Lu. sanguinaria* mientras que en Las Brisas se identificaron 9 especies de las cuales 6 son de importancia epidemiológica: *Lu. cruciata*, *Lu. serrana*, *Lu. panamensis*, *Lu. ylephiletor*, *Lu. trapidoi* y *Lu. youngi*. Al estimar el índice de Jaccard para medir que tan similares eran ambas comunidades con respecto a especies, se obtuvo una similitud equivalente al 53%, identificando en ambas localidades 8 especies en común. Algo muy importante de mencionar es el hecho de que

en ambas localidades se identificaron especies que presentan importancia epidemiológica especialmente *Lu. ylephiletor* y *Lu. trapidoi*.

El porcentaje de similitud que ambas localidades comparten puede estar ligado a la presencia de vegetación; sin embargo, cuando se estimaron los índices de biodiversidad de Shannon-Weaver y Margalef se encontró que Concepción presentó los índices más altos con valores de 2.06 y 2.59 respectivamente. En Las Brisas se obtuvieron valores de 0.73 en el índice de Shannon-Weaver y 1.74 en el índice de Margalef. Valores superiores a 2 son considerados altos y pueden obtenerse en zonas donde existe riqueza y abundancia de especies, específicamente en ecosistemas ricos en vegetación y poco alterados. Por el contrario, valores de diversidad bajos son aquellos inferiores a 2 y se puede obtener en zonas con ecosistemas deforestados y desérticos en especial lugares más urbanizados y alterados (Cavero Avalos., 2012)

En cuanto a la equidad de las especies, se calculó el índice de Pielou y se encontró que Concepción tuvo un resultado de 0.78 mientras que Las Brisas obtuvo un resultado de 0.33, el valor máximo de este índice es 1, por lo que comunidades que obtengan este valor son lugares que presentan abundancia igualitaria en todas sus especies. En este trabajo la localidad de Concepción presentó mayor igualdad en la abundancia de sus especies; comunidades con un valor de 0 significaría que no hay igualdad en la distribución de sus especies. En el cuadro 2 se observa que en Las Brisas la especie que tiene mayor predominancia es *Lu. triramula* (109 individuos) mientras que las demás especies presentan cantidades inferiores a 10 como es el caso de especies como *Lu. serrana*, *Lu. youngi*, *Lu. sordelli* y *Brumptomyia* sp. Únicamente se encontró un individuo en esa localidad, por lo que se puede mencionar que las especies de esta comunidad no se encontraron distribuidas uniformemente.

Factores como la temperatura ambiental y la precipitación pluvial están relacionados con la abundancia de flebotominos y la diversidad de especies. Una de las limitaciones que se tuvo en este trabajo fue la presencia de lluvias con vientos en ambas localidades durante todos los muestreos realizados, lo cual pudo afectar la recolecta de los flebótomos, tomando en cuenta que los fuertes vientos pueden afectar en la capacidad de vuelo de los flebótomos (OMS, 2010). Estudios han reportado de igual forma que la presencia de flebotominos está relacionada con la proximidad de las viviendas humanas en zonas boscosas o selváticas. Otro factor que puede influir en capturas abundantes de flebotomos es la presencia de animales en las zonas de muestreo

(Martínez et al., 2019; Osorio, 2015; Sandoval et al., 1998). En este trabajo se observó la presencia de animales habitando en los alrededores de los peridomicilios muestreados en ambas localidades, encontrándose la presencia de gallinas, cabras, vacas, ovejas, caballos y animales domésticos como perros y gatos, lo que pudo favorecer la captura de los flebótomos.

Los resultados de esta investigación contribuyen a la actualización de la distribución y diversidad de las especies de flebotominos, específicamente en dos localidades del cantón de Pérez Zeledón, para la identificación de posibles zonas de transmisión de leishmaniasis.

5. Conclusiones

- Las localidades de Las Brisas y Concepción son lugares con abundantes zonas boscosas que favorecen la presencia de muchas especies de flebotominos. Sin embargo, la localidad de Concepción al poseer zonas menos alteradas con abundante vegetación presenta mayor riqueza de especies y mayor cantidad de flebótomos recolectados en comparación con Las Brisas, la cual es una zona con mayor urbanización.
- Tanto la localidad de Las Brisas como Concepción poseen factores de riesgo para adquirir leishmaniasis ya que, se identificaron especies antropofílicas incriminados como vectores en el país como *Lu. ylephiletor* y *Lu. trapidoi* al igual que vectores de leishmaniasis en otros países como *Lu. panamensis* y *Lu. cruciata*.
- Existe una similitud en ambas localidades del 53%, teniendo en común 8 especies dentro de las cuales se encuentran *Lutzomyia ylephiletor* y *Lutzomyia trapidoi*, los principales vectores de la leishmaniasis cutánea en Costa Rica.
- Las especies identificadas en este trabajo se encontraban mejor distribuidas en la localidad de Concepción, mientras que en Las Brisas la distribución de las especies no tenía una distribución equitativa existiendo una predominancia de *Lutzomyia triramula* en comparación de las demás especies.

6. Recomendaciones

- Realizar más búsquedas entomológicas en otras localidades de Pérez Zeledón para tener un conocimiento más amplio de la diversidad de especies de flebótomos en esta zona e investigar si existe la presencia de otras especies que puedan ser vectores potenciales de leishmaniasis.
- Realizar estudios de caracterización ambiental en estas localidades para conocer mejor las características que presentan estas localidades y que favorecen la presencia de flebótomos.

7. Bibliografía

- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), 1-40. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Blanco, E. N., Avendaño, E. Z., Sanchez, M., de Velasco, M. R., & Ramirez, C. M. S. (2018). Invasión urbana de flebotomíneos transmisores de *Leishmania* en Mérida, Venezuela. *Duazary*, 15(2), 129-142. <http://dx.doi.org/10.21676/2389783X.2105>
- Botero, D., & Restrepo, M. (2012). Capítulo 8: Leishmaniasis en Parasitosis humanas (5ta edición, pp.315-349. Corporación para investigaciones Biológicas CIB.
- Brazil, R. P., Rodrigues, A. A. F., & Andrade Filho, J. D. (2015). Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas-a mini review. *Entomology, Ornithology & Herpetology*, 4(2), 1-4. <https://doi.org/10.4172/2161-0983.1000144>
- Cabrera, O. L., Munsterman, L. E., Cárdenas, R., Gutiérrez, R., & Ferro, C. (2002). Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of *Leishmania* DNA with PCR in phlebotomine flies. *Biomédica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 22(3), 296–302. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i3.1167>
- Cavero Avalos, M. L. (2012). Diversidad y distribución geográfica de los Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) en dos caseríos endémicos de leishmaniosis cutáneas del distrito de Salpo, Otuzco-La Libertad-enero marzo del 2012. [Tesis de grado, Universidad Nacional de Trujillo]. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/2070>
- Dutari, L. C., & Loaiza, J. R. (2014). American cutaneous leishmaniasis in Panama: a historical review of entomological studies on anthropophilic *Lutzomyia* sand fly species. *Parasites & vectors*, 7(1), 1-10. <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/218>

- Hoyos-López, R., Bolaños, R., Contreras-Gutierrez, M., & Carrero-Sarmiento, D. (2016). Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in a sub-Andean forest from the Norte de Santander, Colombia. *Journal of vector borne diseases*, 53(1), 70. <https://www.proquest.com/docview/1779189435/fulltextPDF/3EA7BE3BE47D41CCPQ/1?accountid=37045>
- Instituto Nacional de Salud [INS]. (2002). Serie de Normas técnicas: Manual de procedimientos de identificación de vectores de leishmaniosis y enfermedad de Carrión. *Ministerio de salud de Perú*. http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/1052_INS-NT36.pdf
- Jaramillo-Antillón, O., Espinoza-Aguirre, A., Calvo-Fonseca, N., Mata-Somarribas, C., & Wasserman, H. (2018). Cutaneous leishmaniasis in Costa Rica: prevention, diagnosis and treatment. *Acta Médica Costarricense*, 60(3), 103-114. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/amc/v60n3/0001-6002-amc-60-03-103.pdf>
- Kelly, P. H., Bahr, S. M., Serafim, T. D., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., Meneses, C., & Wilson, M. E. (2017). The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. *MBio*, 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.01121-16>.
- Martínez, D. C., Ávila, J. L., & Molano, F. (2019). Flebótomos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), presentes en una zona endémica de leishmaniasis cutánea en el occidente de Boyacá, Colombia. *Colombia Médica*, 50(3), 192-200.
- Mejía, Á., Matamoros, G., Fontecha, G., & Sosa-Ochoa, W. (2018). Bionomic aspects of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis*, proven vectors of *Leishmania infantum* in an endemic area of non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras. *Parasites & vectors*, 11(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2605-7>
- Murillo, J., & Zeledón, R. (1985). Brenesia. *Revista de ciencias Naturales del Museo Nacional de Costa Rica*, 1(23), 1-144

- Organización mundial de la Salud [OMS]. (2010). *Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010. Serie de informes técnicos*. OMS. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/82766/WHO_TRS_949_spa.pdf%3Bsequence=
- Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2019). *Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas*. Washington, D.C: OPS. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Osorio, A. R. (2015). *Diversidad de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) en localidades de la Región Fronteriza de Chiapas, México (Doctoral dissertation, INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA)*. <https://catalogoinsp.mx/files/tes/054839.pdf>
- Pech-May, A., Marina, C. F., Vázquez-Domínguez, E., Berzunza-Cruz, M., Rebollar-Téllez, E. A., Narváez-Zapata, J. A., ... & Becker, I. (2013). Genetic structure and divergence in populations of *Lutzomyia cruciata*, a phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) vector of *Leishmania mexicana* in southeastern Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, 254-262. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.02.004>
- Rigg, C. A., Calzada, J. E., Saldaña, A., Perea, M., Chaves, L. F., & Valderrama, A. (2019). *Leishmania* spp. infection rate and feeding patterns of sand flies (Diptera: Psychodidae) from a hyperendemic cutaneous leishmaniasis community in Panamá. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 100(4), 798-807. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0628>
- Sandoval, C. M., Gutiérrez, R., Cárdenas, R., & Ferro, C. (2006). Especies de género *Lutzomyia* (Psychodidae, Phlebotominae) en áreas de transmisión de leishmaniasis tegumentaria y visceral en el departamento de Santander, en la cordillera oriental de los Andes colombianos. *Biomédica*, 26, 218-227. <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v26s1/v26s1a23.pdf>

- Sandoval, C. M., Angulo, V. M., 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), 161-8. <https://revistasoj.s.ucaldas.edu.co/index.php/boletincientifico/article/view/6885/6218>
- Santamaría, E., Munstermann, L. E., & Ferro, C. (2002). Estimating carrying capacity in a newly colonized sand fly *Lutzomyia serrana* (Diptera: Psychodidae). *Journal of economic entomology*, 95(1), 149-154. <https://academic.oup.com/jee/article/95/1/149/2217542?login=true>
- Testa, J. M., Montoya-Lerma, J., Cadena, H., Oviedo, M., & Ready, P. D. (2002). Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. *Acta tropica*, 84(3), 205-218. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(02\)00187-0](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(02)00187-0)
- Torrellas, A., Ferrer, E., Cruz, I., Lima, H. D., Delgado, O., Rangel, J. C., ... & Feliciangeli, M. D. (2018). Molecular typing reveals the co-existence of two transmission cycles of American cutaneous leishmaniasis in the Andean Region of Venezuela with *Lutzomyia migonei* as the vector. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180323>
- Valdivia, H. O., De Los Santos, M. B., Fernandez, R., Baldeviano, G. C., Zorrilla, V. O., Vera, H., Lucas, C. M., Edgel, K. A., Lescano, A. G., Mundal, K. D., & Graf, P. C. F. (2012). Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia auraensis* in Madre de Dios, Peru, detected by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(3), 511–517. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0708>
- Vargas, W. G., & Úsuga, G. Z. (2022). Especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) en el área de influencia de la Central Hidroeléctrica Sogamoso (Santander,

Colombia). *Boletín Científico. Centro de Museos*, 26(1), 121-133.
<https://revistasoj.s.ucaldas.edu.co/index.php/boletincientifico/article/view/6885/6218>

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). *American Entomological Institute* (54), 1-887.

Zeledón, R., Murillo, J., & Gutiérrez, H. (1985). Flebótomos antropófilos y leishmaniasis cutánea en Costa Rica. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)*; 99 (2).
<https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/16769/v99n2p163.pdf?sequence=1>

ARTÍCULO II:

Búsqueda de fuentes alimenticias e infección natural con *Leishmania* spp. en flebotominos de dos localidades de Pérez Zeledón, Costa Rica

Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida, ocasionada por protozoos intracelulares del género *Leishmania*. Se caracteriza por presentar diferentes manifestaciones clínicas dependiendo de la especie de *Leishmania* que se encuentre parasitando. En Costa Rica se ha asociado a *Leishmania panamensis* y *Leishmania braziliensis* con las formas cutánea y mucocutánea, y a *Leishmania infantum/chagasi* con las formas visceral y cutánea atípica. Los vectores involucrados como transmisores de las formas cutáneas son *Lutzomyia ylephiletor* y *Lutzomyia trapidoi* y de las formas visceral y cutánea atípica es *Lutzomyia longipalpis*. Recientemente, en el 2020 se reportó por primera vez la presencia de *Leishmania guyanensis* en el país; sin embargo, no se conoce el vector involucrado en su transmisión. El objetivo de este estudio fue detectar infección natural de *Leishmania* spp. en flebotomos de dos localidades del distrito Daniel Flores de Pérez Zeledón, así como determinar las fuentes alimenticias. Las hembras recolectadas en las comunidades de Las Brisas y Concepción fueron identificadas taxonómicamente. Aquellas que no se encontraban alimentadas con sangre fueron agrupadas en grupos de 1 a 5 hembras de acuerdo con la especie, localidad y gira realizada. Las hembras que se encontraban ingurgitadas con sangre fueron analizadas individualmente. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (q-PCR) amplificando el kDNA de *Leishmania* spp. Las muestras positivas fueron sometidas a un PCR de punto final amplificando un producto de 330 pb, aproximadamente, y posteriormente fueron secuenciados. Se detectaron cuatro muestras positivas con el q-PCR. Dos muestras eran de grupos de hembras sin sangre pertenecientes a las especies de *Lutzomyia trapidoi* y *Lutzomyia triramula*, respectivamente, y dos correspondían a hembras con sangre de las especies *Lutzomyia ovallesi* y *Lutzomyia trapidoi*. Los resultados de las secuencias mostraron que en el grupo y en la hembra ingurgitada con sangre de cabra pertenecientes a *Lu. trapidoi* estaban infectados con *L. braziliensis* (100% de similitud en GenBank), mientras que las secuencias obtenidas de la hembra ingurgitada con sangre de cabra proveniente de *Lu. ovallesi* y de un grupo de *Lu. triramula* no pudieron identificarse a nivel de especie por lo que en este trabajo se reportaron como *Leishmania* spp. La secuencia de *Lu. ovallesi* presentaba una similitud del 98% con secuencias de aislamientos pertenecientes a especies de *Leishmania* no identificadas de Brasil

guardadas en GenBank, la secuencia también presentó una similitud del 96% con una secuencia de *Leishmania naiffi* de Guyana francesa mientras que la secuencia obtenida de *Lu. triramula* presentó una similitud del 97% con aislamientos de *Leishmania* spp. provenientes de Brasil. En cuanto a la determinación de fuentes alimenticias, el análisis por PCR mostró que 17 hembras ingurgitadas pertenecientes a las especies de *Lu. cruciata*, *Lu. ovallesi*, *Lu. trapidoi*, *Lu. panamensis*, *Lu. sanguinaria*, *Lu. youngi*, *Lu. ylephiletor*, *Lu. serrana*, *Lu. geniculata* y *Brumptomyia* sp. (54.8%) se habían alimentado de sangre de aves y 14 (45.2 %) se habían alimentado de mamífero, en este trabajo no se detectó ADN de humanos.

Palabras clave

Leishmania, *Lutzomyia*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania naiffi*, fuentes alimenticias

Abstract

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by intracellular protozoa of the genus *Leishmania*. It is characterized by presenting a clinical polymorphism depending on the species of *Leishmania* that is parasitizing. In Costa Rica, *Leishmania panamensis* and *Leishmania braziliensis* have been associated with the cutaneous and mucocutaneous forms, and *Leishmania infantum/chagasi* with the visceral and atypical cutaneous forms. The vectors involved as transmitters of the cutaneous forms are *Lutzomyia ylephiletor* and *Lutzomyia trapidoi* and of the visceral and atypical cutaneous forms is *Lutzomyia longipalpis*. Recently, in 2020, the presence of *Leishmania guyanensis* was reported for the first time in the country, however, the vector involved in its transmission is not known. The objective of this study was to detect natural infection of *Leishmania* spp. in sandflies from two locations in the Daniel Flores district of Pérez Zeledón, as well as to determine the food sources. The females collected in the communities of Las Brisas and Concepción were taxonomically identified. Those that were not fed with blood were grouped into groups of 1 to 5 females according to the species, locality and tour carried out. The females that were engorged with blood were analyzed individually. A real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed amplifying the kDNA of *Leishmania* spp. Positive samples were subjected to endpoint PCR amplifying a product of approximately 330 bp, and were subsequently sequenced. Four positive samples were detected with qPCR. Two samples were from groups of bloodless females belonging to the species of *Lutzomyia trapidoi* and *Lutzomyia triramula*, respectively, and two corresponded to females with blood of the species *Lutzomyia ovallesi* and *Lutzomyia trapidoi*.

The results of the sequences showed that in the group and in the female engorged with goat blood belonging to *Lu. trapidoi* were infected with *L. braziliensis* (100% similarity in GenBank), while the sequences obtained from the female engorged with goat blood from *Lu. ovalessi* and a group of *Lu. triramula* could not be identified to the species level, so in this work they were reported as *Leishmania* spp. *Lu. ovalessi* sequence had a similarity of 98% with sequences of isolates belonging to unidentified *Leishmania* species from Brazil stored in GenBank, the sequence also had a similarity of 96% with a sequence of *Leishmania naiffi* from French Guiana while the sequence obtained from *Lu. triramula* presented a similarity of 97% with isolates of *Leishmania* spp. from Brazil. Regarding the determination of food sources, the PCR analysis showed that 17 engorged females belonging to the species of *Lu. cruciata*, *Lu. Ovalessi*, *Lu. trapidoi*, *Lu. panamensis*, *Lu. sanguinaria*, *Lu. youngi*, *Lu. ylephiletor*, *Lu. Serrana*, *Lu. geniculata* and *Brumptomyia* sp. (54.8%) had fed on the blood of birds and 14 (45.2%) had fed on mammals, in this work no human DNA was detected.

Keywords

Leishmania, *Lutzomyia*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania naiffi*, food sources

1. Introducción

La leishmaniasis es considerada por la OMS como un grupo de enfermedades parasitarias zoonóticas causadas por protozoos intracelulares del género *Leishmania*. Se describen alrededor de 22 especies patógenas pertenecientes a este género. Este parásito es transmitido de manera vectorial, principalmente por la picadura de dípteros hematófagos pertenecientes a la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae, conocidos como flebótomos (OPS, 2019). En América, la enfermedad es transmitida principalmente por hembras del género *Lutzomyia* (Brazil et al., 2015; Kelly et al., 2017; OPS, 2019). Se han descrito más de 30 especies de flebotominos en la parte Neotropical que pueden transmitir el parásito antropogénica o zoonóticamente (Mejía et al., 2018). Este protozoario se ha encontrado con frecuencia hospedando una amplia variedad de animales, por lo que es considerado como zoonótico y antropozoonótico, pocas especies son estrictamente antroponóticas (Akhoundi et al., 2017). Existen flebótomos que se alimentan de vertebrados específicos, sin embargo, se ha demostrado que algunos pueden ser oportunistas al alimentarse de una gran variedad de huéspedes los cuales, pueden actuar como reservorios de la enfermedad (Carvalho et al., 2017).

Estudios sobre ingesta de fuentes alimenticias en flebótomos han contribuido a comprender la dinámica de transmisión de la enfermedad en una determinada zona, además de identificar reservorios potenciales del parásito. En países como Brasil y Ecuador han identificado a las aves como la fuente principal de alimento de muchas especies de flebótomos (Anaguano et al., 2015; Carvalho et al., 2017), otros estudios realizados en Brasil, Colombia y Perú han identificado mamíferos como fuente principal de alimento, sin embargo, muchos de las preferencias alimenticias se ven sujetas a la disponibilidad del huésped y la cercanía que tengan con los flebótomos (Anaguano et al., 2015).

La leishmaniasis cutánea (LC) y la leishmaniasis mucocutánea (LMC) son endémicas en 18 países de América, solo en el 2019 fueron reportados 41.617 casos de LC, con una tasa de incidencia de 18.78 casos por 100.000 habitantes, siendo Brasil, Colombia, Perú, Nicaragua y Bolivia los que notificaron la mayor cantidad de casos, seguidos de El Salvador, Guatemala, Honduras y México (OPS, 2020).

Durante el año 2019 en Costa Rica hubo una ocurrencia de 601 casos reportados de LC con una tasa de incidencia de 11,3 casos /100.000 habitantes, reportándose una disminución del 57% en la incidencia en comparación con el año 2018 (OPS, 2020).

En estudios realizados en Costa Rica, se logró aislar *Leishmania panamensis* en *Lutzomyia ylephiletor* y *Lutzomyia trapidoi* (Jaramillo-Antillón et al., 2018; Murillo & Zeledón., 1985). En otras investigaciones, aislaron *L. panamensis* en pacientes provenientes de los cantones de San José, Acosta y Pérez Zeledón en la provincia de San José; San Ramón, San Carlos y los Chiles, en la provincia de Alajuela; Buenos Aires y Puerto Jiménez en la provincia de Puntarenas; Guácimo, Cariari, Guápiles, Siquirres, Pocora, Talamanca, Sixaola, así como en el cantón central, en la provincia de Limón; Sarapiquí, en la provincia de Heredia y Turrialba, en la provincia de Cartago. Además, encontraron *Leishmania braziliensis* en pacientes de Pérez Zeledón y de Guápiles. Con base en esos hallazgos concluyeron que *L. panamensis*, es el principal agente etiológico de la leishmaniasis cutánea, mientras que *L. braziliensis* es considerado el principal causante de la forma mucocutánea de la enfermedad (Jaramillo-Antillón et al., 2009; 2018; Murillo & Zeledón., 1985).

En el 2020 se realizó el primer reporte de leishmaniasis cutánea ocasionada por *Leishmania guyanensis*, las muestras provenían de pacientes del distrito Daniel Flores de Pérez Zeledón (Campos-Fuentes et al., 2020). Según datos de la Dirección de Vigilancia de la Salud del Ministerio de Salud, en este cantón se presentó una tasa de incidencia de 48.16 casos de leishmaniasis cutánea, durante el periodo del 2014-2016 (Jaramillo-Antillón et al., 2018).

El objetivo de este trabajo fue detectar infección natural de *Leishmania* spp. en flebótomos de dos localidades del distrito Daniel Flores en Pérez Zeledón y determinar sus fuentes alimenticias.

2. Materiales y métodos

2.1 Sitio de muestreo

El estudio se llevó a cabo en las localidades de Las Brisas (coordenadas 9.3643851 N, -83.6880947 O) y Concepción (coordenadas 9.234303 N, -83.6664676 O) del distrito Daniel Flores en el cantón de Pérez Zeledón, en la provincia de San José. Este distrito se encuentra a una altura media de 639 m.s.n.m, su clima es húmedo, mayoritariamente nublado con presencia de lluvias generalmente durante todo el año con una temperatura media que varía entre 21°C a 30°C y una precipitación de 479 mm al año, con una población de 33,537 habitantes para el 2011, de acuerdo con el último censo del INEC.

La elección de las localidades fue determinada por el hallazgo de *Leishmania guyanensis* en dos muestras de lesiones cutáneas, siendo este hallazgo el primer reporte de esta especie en el país. Las muestras pertenecían a pacientes procedentes de Concepción y Las Brisas, según la investigación epidemiológica se trata de casos autóctonos (Campos Fuentes et al., 2020; Campos Fuentes, 2021).

2.2 Muestreo y recolección de flebótomos

Se realizaron cuatro muestreos por 3 noches consecutivas durante el periodo de abril a agosto del 2021. Se colocaron seis trampas luminosas tipo CDC en cada localidad a una altura de aproximadamente 1 metro sobre el suelo en zonas peridomiciliares y boscosas, con abundante vegetación y cerca de sitios de reposo de animales durante toda la noche a partir de las 18:00 horas hasta las 6:00 horas del día siguiente. Los especímenes capturados fueron transportados en frascos

con alcohol al 70% debidamente rotulados para su almacenamiento, hasta su montaje e identificación taxonómica. Posteriormente las muestras se llevaron al Laboratorio de Entomología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

2.3 Identificación de flebótomos

En el laboratorio, los insectos identificados como flebótomos se separaron del resto de los insectos colectados, basándose en el tamaño, color, patas largas y alas. Las muestras conservadas en alcohol se hidrataron en PBS 1X durante 30 min, luego se aclararon con KOH al 10% durante 3 horas y se lavaron en PBS 1X durante 5 min. Posteriormente, los especímenes fueron montados en un portaobjetos para la disección de la cabeza. El abdomen de las hembras se separó del resto del cuerpo para realizarles extracción y detección de ADN de *Leishmania* spp. y para determinar las fuentes alimenticias. Los abdómenes se almacenaron en viales de 1.5 ml a -20°C hasta el momento de realizar la extracción del ADN total (Cabrera et al., 2002; INS, 2002; Valdivia et al., 2012; Rigg et al., 2019). Luego de la disección, se agregó medio de Hoyer para fijar las piezas y realizar la identificación establecida por Young y Duncan en base a la genitalia y el cibario (Young & Duncan, 1994).

2.4 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se formaron grupos de 1-5 hembras según la especie, localidad y gira. Las hembras que presentaron sangre en sus abdómenes fueron separados del resto de flebótomos para la identificación de fuentes alimenticias y fueron analizadas individualmente. La extracción de ADN se realizó mediante el kit comercial DNeasy Blood® & Tissue (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se almacenó a -20°C hasta su procesamiento por medio de las pruebas moleculares de detección de *Leishmania* spp. y la determinación de fuentes alimenticias (Rigg et al., 2019).

2.5 Detección molecular de *Leishmania* spp.

2.5.1 PCR en tiempo real para la detección de *Leishmania* spp.

Para detectar las hembras infectadas con *Leishmania* spp. se realizó un PCR en tiempo real (q-PCR) con EVA Green mediante los cebadores MLF 5'-CGTTCTGCGAAAACCGAAA-3' y MLR 5'-CGGCCCTATTTTACACCAACC amplificando un producto de 110 pb del minicírculo del kinetoplasto (kDNA) (Ceccarelli et al., 2014). Las reacciones se realizaron en un volumen final

de 20 µl, agregando 5 µl de ADN, 10 µl de EVA Green PCR master mix, 0.5 µl de cada cebador y 4 µl de agua libre de nucleasas

Las condiciones de ciclado consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C por 20 segundos, seguidos por 50 ciclos de 95°C por 10 minutos, seguidos por 50 ciclos de 95°C por 30 s, 65 °C por 20s y 72°C por 20s y un estado de disociación de 55-95°C. y un estado de disociación de 55-95°C. Como controles positivos se utilizaron cultivos de *Leishmania panamensis*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania guyanensis* donadas por el Laboratorio de Parasitología del Instituto Costarricense de Investigaciones y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA).

Todas las muestras que amplificaron con una curva de crecimiento superando el umbral Ct (calculado automáticamente por el equipo) entre los primeros 50 ciclos fueron consideradas positivas y se sometieron a un segundo PCR de punto final.

2.5.2 PCR de tiempo final para la identificación de las especies de *Leishmania*

El ADN de las muestras positivas en el qPCR se sometió a un PCR de punto final utilizando los cebadores forward: LITSR 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3' y reverse: L5.8S 5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3' amplificando un producto de 330 pb de la región ITS-1. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl, se agregaron 10 µl de ADN y 25 µl de DreamTaq™ PCR Master Mix 2X (ThermoScientific, USA), 2 µl de cada uno de los primers y 11 µl de agua libre de nucleasas (ThermoScientific, USA).

Las condiciones de ciclado consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 s, 55° C durante 30 s, 72° por 60 s y una extensión final por 5 min. Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 1% en un transiluminador (Arrivillaga-Henríquez et al., 2017; Rigg et al., 2019)

2.5.3 Secuenciación de *Leishmania* spp.

Los productos amplificados mediante PCR de *Leishmania* spp. fueron enviados a la compañía Macrogen en Seoul, Corea del Sur, para secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit y se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank mediante la utilización del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

2.6 Determinación de fuentes alimenticias

El ADN extraído de las hembras alimentadas con sangre fue analizado para determinar las fuentes alimenticias de las especies identificadas. Se ejecutó un PCR de punto final que amplificó la región ITS de humano (200 pb) y aves (169 pb) (Sosa-Ochoa et al., 2014) y el gen del citocromo b (Cyt b) de mamíferos (623 pb) (Kent & Norris, 2005) mediante los siguientes cebadores: humano (forward 5'-GAGATCGAGACCACGGTGAAA-3' y reverse 5'-TTTGAGACGGAGTCTCGTT-3'), aves (forward 5'-CTGGGTTGAAAAGGACCACAGT-3' y reverse 5'-GTGACGCACTGAACAGGTTG-3') y mamíferos (forward 5'-TGAGGACAAATATCATTCTGAGG-3' y reverse 5'-GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA-3'). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 12.5 µl, agregando 2.5 µl de ADN, 0.5 µl de cada cebador específico de cada animal, 6.25 µl de DreamTaq™ PCR Master Mix 2X (ThermoScientific, USA) y 2.75 µl de agua libre de nucleasas.

Para la determinación de ADN de ave se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min. Para la detección de ADN de humano se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 56°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min. Para la detección de ADN de mamíferos se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 58°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min. Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 1% en un transiluminador. Las muestras que amplificaron con el PCR de mamíferos fueron enviadas a la compañía Macrogen en Seoul, Corea del Sur para ser secuenciadas.

3. Resultados

3.3.1 Infección natural por *Leishmania* spp en flebotominos hembras, recolectados en el distrito Daniel Flores de Pérez Zeledón.

Se recolectaron 131 hembras sin sangre las cuales fueron organizadas en 52 grupos mientras que 31 hembras ingurgitadas fueron analizadas de manera individual. Se analizaron 20 grupos de hembras sin sangre y 7 hembras ingurgitadas provenientes de la comunidad de Las Brisas, mientras que de Concepción se analizaron 32 grupos de hembras sin sangre y 24 hembras ingurgitadas. Las especies de flebótomos que tuvieron la mayor cantidad de grupos correspondían a *Lu. triramula* (27 grupos), *Lu. cruciata* (13 grupos) y *Lu. panamensis* (7 grupos). De las 31 hembras ingurgitadas con sangre, se identificaron 11 especies, presentando mayor cantidad de individuos las especies *Lu. cruciata* (n=10), *Lu. ovallesi* (n=3) y *Lu. panamensis* (n=3). Nueve de las especies son consideradas antropofílicas y el resto correspondían a especies zoofílicas. En la comunidad de Concepción se encontró la mayor cantidad de hembras ingurgitadas con sangre (n=24) en comparación con Las Brisas en donde se encontraron 7 hembras con sangre. En el cuadro 1 se resume la distribución de los flebótomos por grupos.

Cuadro 1: Distribución de grupos de flebotominos y hembras con sangre analizados por localidad (Las Brisas y Concepción) y especies de *Lutzomyia*.

Especie	Las Brisas		Concepción	
	Grupos de hembras sin sangre	Hembras con sangre	Grupos de hembras sin sangre	hembras con sangre
<i>Lutzomyia triramula</i>	15	2	8	2
<i>Lutzomyia cruciata</i> *	0	2	3	8
<i>Lutzomyia panamensis</i> *	2	0	2	3
<i>Lutzomyia serrana</i> *	0	0	4	1
<i>Lutzomyia youngi</i> *	0	1	3	1
<i>Lutzomyia geniculata</i> *	0	0	3	1
<i>Lutzomyia ylephiletor</i> *	1	0	2	1
<i>Brumptomyia</i> sp.	1	0	1	2
<i>Lutzomyia trapidoi</i> *	0	2	1	0
<i>Lutzomyia ovallesi</i> *	0	0	0	3
<i>Lutzomyia runoides</i>	0	0	2	0
<i>Lutzomyia carrerai-thula</i> *	0	0	2	0
<i>Lutzomyia sanguinaria</i> *	0	0	0	2

<i>Lutzomyia barrettoii majuscula</i> *	0	0	1	0
<i>Lutzomyia sordellii</i>	1	0	0	0
Total	20	7	32	24

* Especies antropofílicas

La presencia de *Leishmania* spp. se determinó en cuatro grupos de flebótomos. La Figura 1 muestra la amplificación de dos grupos pertenecientes a *Lu. triramula* proveniente de Las Brisas y *Lu. trapidoi* proveniente de Concepción. Se observa también la amplificación de una muestra de una hembra ingurgitada de *Lu. ovallesi* proveniente de Concepción. En la Figura 2 se observa la amplificación de una hembra ingurgitada de *Lu. trapidoi* proveniente de Las Brisas.

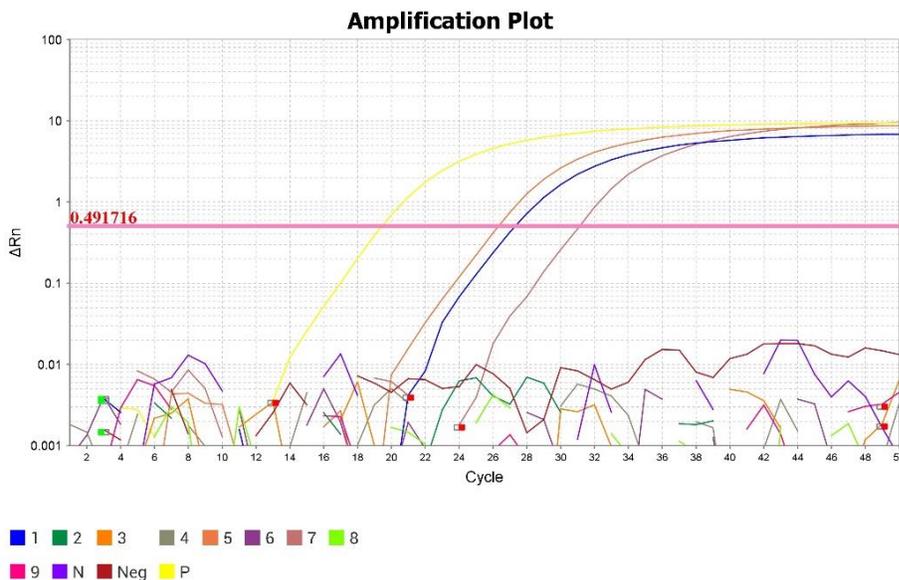


Figura 1: Curva de amplificación del kDNA de las muestras positivas mediante la técnica de q-PCR-*Leishmania* spp. Se observa crecimiento en la curva de amplificación de un grupo de *Lu. triramula* (muestra 1) proveniente de Las Brisas, una hembra ingurgitada de *Lu. ovallesi* (muestra 5) y un grupo de *Lu. trapidoi* (muestra 7) procedente de Concepción. Se observa amplificación de la muestra control perteneciente a *Leishmania panamensis*.

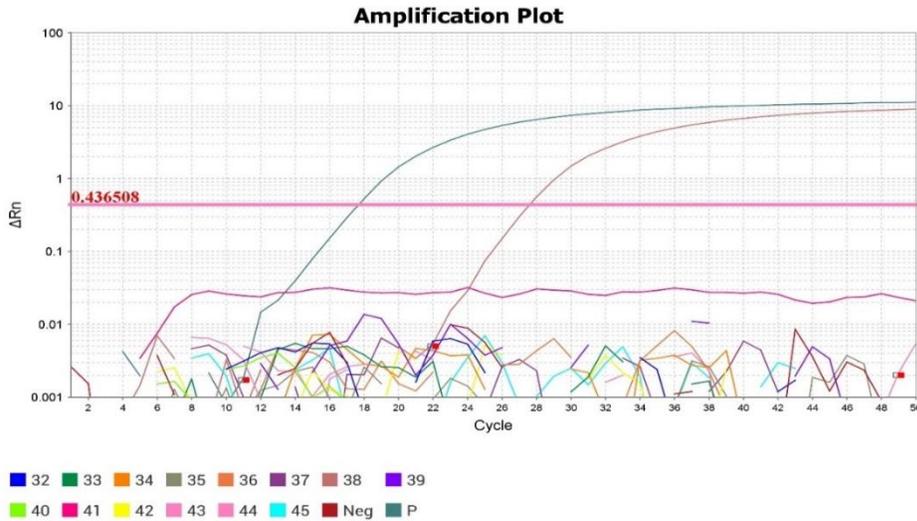


Figura 2: Curva de amplificación del kDNA de muestra positiva mediante la técnica de q-PCR *Leishmania* spp. Se observa crecimiento en la curva de amplificación de una hembra ingurgitada de *Lu. trapidoi* (muestra 38) proveniente de Las Brisas y de la muestra control perteneciente a *Leishmania panamensis*.

Los dos grupos de flebótomos identificados como positivos a *Leishmania* spp. pertenecían a una especie antropofílica: *Lu. trapidoi* y una especie zoofílica: *Lu. triramula* mientras que las dos hembras ingurgitadas positivas a *Leishmania* spp. pertenecían a dos especies antropofílicas: *Lu. ovallesi* y *Lu. trapidoi* (ver Cuadro 2).

Cuadro 2: Detección de *Leishmania* spp mediante qPCR en grupos y en hembras ingurgitadas de flebotominos recolectados en las localidades de Las Brisas y Concepción de Daniel Flores.

Especie	qPCR- <i>Leishmania</i> spp.			
	Grupos de flebótomos de Las Brisas	Hembras ingurgitadas de Las Brisas	Grupos de flebótomos de Concepción	Hembras ingurgitadas de Concepción
<i>Lutzomyia triramula</i>	1	0	0	0
<i>Lutzomyia trapidoi</i> *	0	1	1	0
<i>Lutzomyia ovallesi</i> *	0	0	0	1
Total de muestras positivas	1	1	1	1

* Especies antropofílicas

3.3.2 Identificación de especies de *Leishmania*

Las cuatro muestras positivas por el q-PCR-*Leishmania* spp. fueron sometidas a un PCR de punto final en el que se obtuvo un producto de 330 pb aproximadamente de la región ITS-1 de *Leishmania* spp (Figura 3),

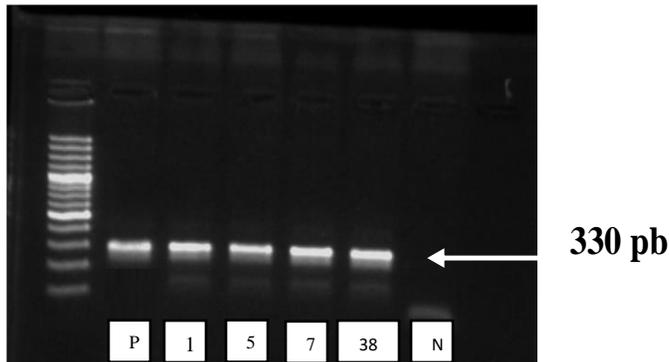


Figura 3: Productos de amplificación de una región aproximadamente de 330 pb de ITS-1 de *Leishmania* spp. mediante la técnica de PCR visualizados en un gel de agarosa al 1%. Orden de las muestras carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control positivo de *Leishmania panamensis*, carril 3: muestra 1, carril 4: muestra 5, carril 5: muestra 7, carril 6: muestra 38 y carril 7: control negativo.

Al comparar las secuencias de ITS-1 de *Leishmania* spp con secuencias de la base de datos del GenBank se encontró que dos secuencias que provenían de una hembra ingurgitada y de un grupo de *Lu. trapidoi* presentaron un 100% de similitud con aislamientos de *Leishmania braziliensis* de Brasil, uno de los grupos provenía de Concepción (código de acceso: KP274863.1 con 247/247 pb), mientras que la hembra ingurgitada provenía de Las Brisas (código de acceso: KP274863.1 con 240/240 pb).

Una de las secuencias que provenía de una hembra ingurgitada de *Lutzomyia ovallesi* de Concepción presentó una similitud del 98 % con secuencias de especies no identificadas de *Leishmania* spp. (Cod. de acceso: MN638732.1 con 300/304pb, MN759037.1 con 328/334 pb, MN638737.1 con 320/324 pb) provenientes de Brasil, además, también presentó una similitud del 96% con un aislamiento de *Leishmania naiiffi* (código de acceso: DQ182543.1 con 328/343) proveniente de Guyana francesa. Similarmente la secuencia obtenida del grupo de *Lutzomyia triramula* no pudo ser identificada a nivel de especie, ya que, al comparar con otras secuencias en GenBank se encontró una similitud del 97% con aislamientos de especies de *Leishmania* sin identificar (Cod. Acceso: MN638732.1 con 293/301 pb, MN638737.1 con 299/307 pb,

MN759037.1 con 297/307 pb). Los aislamientos que no pudieron identificarse a nivel de especie se determinaron como *Leishmania* spp. (Cuadro 3).

Cuadro 3: Resultados de secuenciación en muestras positivas en q-PCR-*Leishmania* spp.

Especie de flebótomo	Comunidad	Especie de <i>Leishmania</i> en GenBank	Porcentaje de similitud, código de acceso en GenBank
<i>Lutzomyia triramula</i>	Las Brisas	<i>Leishmania</i> spp.	97% (Cod. Acceso: MN638732.1, 293/301 pb; MN638737.1, 299/307 pb; MN759037.1, 297/307 pb)
<i>Lutzomyia ovallesi</i> *	Concepción	<i>Leishmania</i> spp.	98% (Cod. de acceso: MN638732.1, 300/304pb; MN759037.1, 328/334 pb; MN638737.1, 327/331 pb)
		<i>Leishmania naiffi</i>	96% (Cod. de acceso: DQ182543.1, 328/343 pb)
<i>Lutzomyia trapidoi</i> *	Concepción	<i>Leishmania braziliensis</i>	100% (Cod. de acceso: KP274863.1, 247/247 pb)
<i>Lutzomyia trapidoi</i> *	Las Brisas	<i>Leishmania braziliensis</i>	100% (Cod. de acceso: KP274863.1, 240/240 pb)

* Especies antropofílicas

3.3.3 Determinación de fuentes alimenticias en hembras con sangre de las localidades Las Brisas y Daniel Flores.

De las 31 hembras ingurgitadas con sangre, 17 muestras (54.8%) resultaron positivas para ADN de aves, amplificando un producto de 169 pb (Figura 4), y 14 muestras (45.2 %) resultaron positivas para ADN de mamíferos, amplificando un producto de 623 pb (Figura 5). Las muestras que amplificaron para ADN de mamíferos fueron secuenciadas para identificar las especies de mamíferos, 11 muestras coincidieron con ADN de *Capra hircus* (cabra), 2 muestras coincidieron con ADN de *Ovis aries* (oveja) y una muestra de *Equus caballus* (caballo). No se detectó ADN perteneciente a humanos en ninguna especie identificada en este trabajo (Figura 6).

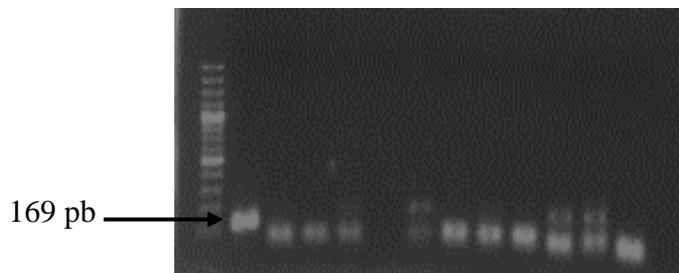


Figura 4: Amplificación de un fragmento de aproximadamente 169 pb de la región ITS de aves. Se utilizó ADN de ave como control positivo (pocillo 2).

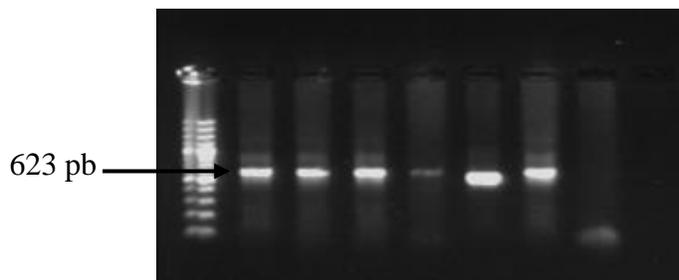


Figura 5: Amplificación de un fragmento de aproximadamente 623 pb del gen Cyt b de mamíferos. Se utilizó ADN de perro como control positivo (pocillo 2).

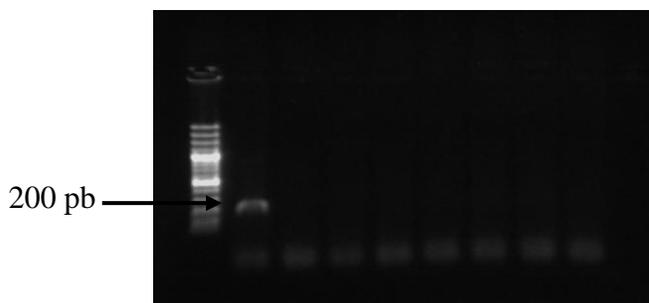


Figura 6: Amplificación de un fragmento de aproximadamente 200 pb de la región de ITS de humanos. Se utilizó ADN de humano como control positivo (pocillo 2).

En la comunidad de Las Brisas, en 7 hembras ingurgitadas con sangre, se detectó ADN de ave en 3 muestras (*Lu. cruciata* y *Lu. triramula*), ADN de cabra en 3 muestras (*Lu. cruciata*, *Lu. trapidoi* y *Lu. youngi*) y 1 especie que presentaba ADN de caballo (*Lu. trapidoi*). De 24 hembras ingurgitadas con sangre en la comunidad de Concepción se detectó ADN de ave en 14 muestras (*Lu. cruciata*, *Lu. ovallesi*, *Lu. panamensis*, *Lu. triramula*, *Lu. sanguinaria*, *Lu. youngi*, *Lu. geniculata*, *Lu. serrana* y *Brumptomyia* sp.), ADN de cabra en 8 muestras (*Lu. cruciata*, *Lu. ovallesi*, *Lu. panamensis*, *Lu. sanguinaria* y *Brumptomyia* sp.) y ADN de oveja en dos muestras pertenecientes a las especies de *Lu. ylephiletor* y *Lu. cruciata*. A nivel de especie, se encontró que *Lu. cruciata* presentó la mayoría de fuentes alimenticias, identificándose ADN de aves, cabras y ovejas, mientras que las especies en las que se identificó una fuente alimenticia fueron *Lu. triramula* con ADN de ave y *Lu. trapidoi* con ADN de mamífero (caballo y cabra). Dos hembras ingurgitadas positivas a *Leishmania* spp. (*Lu. ovallesi* y *Lu. trapidoi*) presentaron sangre de cabra en sus abdómenes.

Cuadro 4: Resultados de PCR de ingesta alimenticia en hembras con sangre según la especie y localidad.

Especie	Localidad	Humano	Aves	Cabra	Oveja	Caballo
<i>Lutzomyia cruciata</i> *	Las Brisas	-	+	-	-	-
<i>Lutzomyia cruciata</i> *	Las Brisas	-	-	+	-	-
<i>Lutzomyia cruciata</i> *	Concepción	-	+	-	-	-
<i>Lutzomyia cruciata</i> *	Concepción	-	+	-	-	-
<i>Lutzomyia cruciata</i> *	Concepción	-	+	-	-	-
<i>Lutzomyia cruciata</i> *	Concepción	-	+	-	-	-
<i>Lutzomyia cruciata</i> *	Concepción	-	-	+	-	-
<i>Lutzomyia cruciata</i> *	Concepción	-	-	+	-	-
<i>Lutzomyia cruciata</i> *	Concepción	-	-	+	-	-
<i>Lutzomyia cruciata</i> *	Concepción	-	-	-	+	-
<i>Lutzomyia ovallesi</i> *	Concepción	-	+	-	-	-
<i>Lutzomyia ovallesi</i> *	Concepción	-	-	+	-	-
<i>Lutzomyia ovallesi</i> *	Concepción	-	-	+	-	-
<i>Lutzomyia panamensis</i> *	Concepción	-	-	+	-	-
<i>Lutzomyia panamensis</i> *	Concepción	-	+	-	-	-
<i>Lutzomyia panamensis</i> *	Concepción	-	+	-	-	-
<i>Lutzomyia sanguinaria</i> *	Concepción	-	+	-	-	-
<i>Lutzomyia sanguinaria</i> *	Concepción	-	-	+	-	-
<i>Lutzomyia trapidoi</i> *	Las Brisas	-	-	+	-	-
<i>Lutzomyia trapidoi</i> *	Las Brisas	-	-	-	-	+
<i>Lutzomyia youngi</i> *	Las Brisas	-	-	+	-	-
<i>Lutzomyia youngi</i> *	Concepción	-	+	-	-	-
<i>Brumptomyia sp.</i>	Concepción	-	+	-	-	-
<i>Brumptomyia sp.</i>	Concepción	-	-	+	-	-
<i>Lutzomyia ylephiletor</i> *	Concepción	-	-	-	+	-
<i>Lutzomyia triramula</i>	Las Brisas	-	+	-	-	-
<i>Lutzomyia triramula</i>	Las Brisas	-	+	-	-	-
<i>Lutzomyia triramula</i>	Concepción	-	+	-	-	-
<i>Lutzomyia triramula</i>	Concepción	-	+	-	-	-
<i>Lutzomyia geniculata</i> *	Concepción	-	+	-	-	-
<i>Lutzomyia serrana</i> *	Concepción	-	+	-	-	-
Total		0 (0%)	17(54.8%)	11 (35.5%)	2 (6.5%)	1 (3.2%)

* Especies antropofílicas

4. Discusión

El conocimiento de las especies de *Leishmania* que se encuentran circulando en el país puede ayudar a mejorar el manejo y a tener una mejor comprensión de la enfermedad, además, es importante identificar especies de flebotominos que pueden actuar como vectores del parásito para contar con más información acerca del ciclo de la transmisión de la enfermedad en una determinada zona; debido a esto la infección natural con parásitos de *Leishmania* spp. en las

diferentes poblaciones de flebótomos es uno de los criterios más importantes en la incriminación vectorial (Quiroga et al., 2017).

Los últimos reportes con los que se cuenta indican que, para el 2016, Pérez Zeledón reportaba una tasa de incidencia de 48.1/100.000 habitantes (Jaramillo-Antillón et al., 2018), sin embargo, no hay datos publicados que actualicen esta información a nivel de cantones.

En Costa Rica se conoce que una de las dos especies transmisoras de leishmaniasis es *Lu. trapidoi*. Estudios por Zeledón y colaboradores identificaron infección por flagelados pertenecientes al complejo *Leishmania braziliensis- panamensis* (Rojas Madriz, 2019; Jaramillo- Antillón et al., 2018; Murillo & Zeledón, 1985), en este trabajo se reafirma que puede jugar un papel importante en la transmisión de leishmaniasis cutánea y mucocutánea. El análisis y comparación de las secuencias de la región ITS-1 de *Leishmania* spp. indicó que dos secuencias que provenían de *Lu. trapidoi* tuvieron 100% de similitud con aislamientos en GenBank de la región ITS-1 de *Leishmania braziliensis*. Este hallazgo concuerda con estudios previos, donde se encontró que en el cantón de Pérez Zeledón se aislaron las especies de *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis* en muestras clínicas de pacientes con leishmaniasis cutánea (Campos-Fuentes et al., 2020). En Concepción, la muestra provenía de un grupo de hembras sin sangre por lo que se trata de una infección natural con *L. braziliensis*, mientras que, en Las Brisas, el hallazgo provenía de una hembra ingurgitada con sangre proveniente de cabras. Si bien es cierto no se puede afirmar que ese espécimen tuviera una infección natural, la presencia de *L. braziliensis* demuestra que esta especie podría encontrarse circulando en ambas localidades de Pérez Zeledón.

Con respecto a otras especies de *Leishmania* detectadas en este trabajo, la secuencia obtenida de la hembra ingurgitada de *Lu. ovallesi* proveniente de Concepción presentó una similitud del 96% con un aislamiento proveniente de Brasil de *Leishmania naiffi* (Cod. de acceso: DQ182543.1), sin embargo, también presentaba similitud del 98% con aislamientos de *Leishmania* spp de Brasil los cuales, no pudieron identificarse a nivel de especie (Cod. de acceso: MN638732.1, MN759037.1, MN638737.1), estudios similares realizados en flebótomos de Brasil y de lesiones ulcerativas en Etiopía utilizaron un porcentaje de similitud a la región ITS-1 mayor al 98% para identificar especie (Tanure et al., 2020; Merdekios et al., 2021). En este trabajo no se puede confirmar la especie de *Leishmania* de ese aislamiento considerando la similitud que la secuencia tuvo con otras especies sin identificar y que el porcentaje de similitud con el aislamiento de *L. naiffi* es

únicamente del 96%. Es importante mencionar que esta especie fue aislada por primera vez en Brasil en un armadillo, su principal reservorio (Fagundes-Silva et al., 2015), aunque se reporta que esta especie se aísla principalmente en armadillos y roedores, hay reportes en países como Brasil, Guyana Francesa, Ecuador, Perú y Surinam de lesiones cutáneas en humanos en los cuales cursa con un cuadro benigno de leishmaniasis cutánea localizada (Coughlan et al., 2018). En cuanto a vectores incriminados, se han reportado varias especies de flebotomos que participan en la transmisión de *L. naiffi*, entre ellas *Lu. trapidoi* y *Lu. gomezi* en Panamá, en otros estudios se ha aislado en menor proporción de *Lu. triramula*, sin embargo, no se ha aislado el parásito en lesiones de humanos en estos países (Quiroga et al., 2017; Coughlan et al., 2018; Rigg et al., 2019).

Con respecto a la especie del flebotomo, este aislamiento provenía de *Lu. ovallesi*, la cual es antropofílica y considerada como un vector en la transmisión de *L. braziliensis* en países de Suramérica como Colombia y Venezuela (Sandoval et al., 1998; 2006). En Costa Rica, este flebotomo ha sido reportado en los cantones de Alajuela (Alajuela), Jiménez (Cartago), Santa Cruz, La Cruz, Liberia (Guanacaste), Siquirres, Limón, Pococí, Talamanca (Limon), Esparza, Montes de Oro, Osa, Golfito, Garabito (Puntarenas) (Murillo & Zeledón, 1985), Puriscal y Acosta (San José) (Murillo & Zeledón, 1985; Jiménez et al., 2000). Tomando en consideración que el aislamiento provenía de una hembra con sangre de cabra, no se puede afirmar que *Lu. ovallesi* presentaba una infección natural ya que la infección pudo adquirirse por alimentarse de un huésped infectado (cabra), sin embargo, considerando que esta especie es considerado un vector en otros países, no se puede descartar que esta especie pueda estar involucrada en la transmisión de leishmaniasis en el país, por lo que es importante seguir realizando más búsquedas entomológicas.

En el caso de *Lu. triramula* proveniente de Las Brisas, el aislamiento de *Leishmania* spp. puede considerarse como una infección natural ya que pertenecía a un grupo de hembras sin sangre, sin embargo, no se determinó la especie de *Leishmania* ya que, la secuencia presentaba una similitud del 97% con aislamientos de *Leishmania* spp. provenientes de Brasil de acuerdo con la base de datos de GenBank (Cod. de acceso: MN638732.1, MN638737.1, MN759037.1). Estudios sobre infección natural de *Leishmania* en flebotominos de Panamá y Brasil mencionan que los flebotomos pueden presentar coinfecciones con tripanosomatidos, lo cual puede afectar la identificación del parásito. También señalan que la región ITS-1 amplificada puede presentar sitios con poca variabilidad por lo que no puede discriminar entre organismos pertenecientes al género *Leishmania* y otros tripanosomatidos cuando existe una coinfección en el flebotomo, sin

mencionar que en este trabajo se amplificó una región de aproximadamente 330 pb, la cual no es de un tamaño suficientemente grande por lo que su especificidad disminuye (Rigg et al., 2019; Tanure et al., 2020). Tomando en consideración estos aspectos, se recomienda realizar extracciones y análisis de los flebótomos de manera individual para establecer mejor la asociación entre la especie del flebótomo y la infección con especies de *Leishmania*.

Lu. triramula es una especie de hábitos zoofílicos que no ha sido incriminada como transmisora de leishmaniasis, sin embargo, en otros estudios en Panamá han encontrado infecciones con *L. naiffi* en *Lu. triramula*, por lo que no se puede ignorar el potencial vectorial que podría poseer (Rigg et al., 2019). En Costa Rica este flebótomo se ha descrito en los cantones de San Carlos en Alajuela, Garabito, Osa, Buenos Aires y Quepo en Puntarenas y en Pérez Zeledón y Puriscal en San José (Murillo & Zeledón., 1985). Aunque no es considerado como un vector involucrado en la transmisión de leishmaniasis a los humanos, estudios realizados en flebótomos de Panamá, detectaron infecciones por *Leishmania* spp en especímenes de *Lu. triramula* por lo que se hipotetiza que su participación en la transmisión de la enfermedad se encuentra en el ciclo selvático debido a sus hábitos zoofílicos (Rigg et al., 2019).

Se necesitan realizar más pruebas utilizando otros marcadores moleculares con cebadores que amplifiquen regiones con tamaños más grandes, de esa manera se obtendrían secuencias más específicas y menos homologas con varias especies. En estudios realizados en Ecuador, recomiendan buscar más de un marcador molecular para realizar la identificación de la especie, como fragmentos del gen de topoisomerasas en paralelo con la región ITS-1 (Arrivillaga-Henríquez et al., 2017), entre otros marcadores para discriminar entre especies se encuentra el gen 18S ARNr, Espaciador transcrito externo (ETS), Cisteína proteasa B (cpB), citocromo b (cyt b) y proteínas de choque térmico (HSP) (Akhoundi et al., 2017). Entre otros métodos se encuentra también PCR-RFLP (PCR asociada a Polimorfismos en longitud de fragmentos de restricción), el cual es un método utilizado para la discriminación entre especies de *Leishmania* que detecta variaciones en los patrones de fragmentos de ADN mediante el uso de enzimas de restricción (Kato et al., 2019).

En este trabajo no se pudo encontrar infección natural por *Leishmania guyanensis* en las hembras recolectadas en ambas localidades, sin embargo, el hallazgo en este trabajo de especies antropofílicas incriminadas como vectores como es el caso de *Lu. trapidoi* o con capacidad

vectorial como *Lu. panamensis* puede sugerir la posibilidad de estar involucradas en su ciclo de transmisión en estas localidades, ya que se ha reportado la detección molecular de infección natural de *Leishmania guyanensis* en *Lu. trapidoi* en países de Suramérica (Arrivillaga-Henríquez et al., 2017).

Estudios de fuentes alimenticias realizados en un área endémica de leishmaniasis en Panamá (2019), sugirieron que la sangre de cerdos, cabras y aves eran las fuentes alimenticias más comunes en los flebótomos de esa zona, por encima de la sangre humana y de perros, siendo *Lu. trapidoi*, *Lu. panamensis* y *Lu. triramula* las especies que presentaron mayor ingesta (Rigg et al., 2019). En este trabajo se detectó que las hembras ingurgitadas de *Lu. trapidoi* y *Lu. ovallesi* positivas a *Leishmania* spp. se habían alimentado de cabras, por lo que no se puede establecer si la infección en estas hembras era natural o proveniente de la sangre encontrada en ellas. En estudios epidemiológicos en ganado bovino, equino, ovino y caprino de zonas endémicas de leishmaniasis han encontrado infecciones por medio de técnicas serológicas y moleculares, sin embargo, no se ha podido establecer el papel de estos animales como reservorios dentro del ciclo de transmisión del parásito por lo que son considerados como reservorios potenciales de *Leishmania* spp. (Rezaei et al., 2022). Estudios realizados en India y en Kenya mencionan que las cabras podrían actuar como reservorios del parásito participando en el ciclo de transmisión y permitiendo la multiplicación del parásito, especialmente en la leishmaniasis visceral (Williams et al., 1991; Singh et al., 2013; Labony et al., 2014). Se necesita realizar más investigaciones para establecer el papel de estos animales en la epidemiología de la leishmaniasis.

El hallazgo y preferencia de sangre aviar encontrado en este trabajo concuerda con diversos estudios en Brasil y Ecuador donde han reportado la sangre aviar como una de las principales fuentes alimenticias para las hembras (Sant'Anna et al., 2008; Afonso et al., 2012; Anaguano et al., 2015). Carvalho y colaboradores (2017) también identificaron una preferencia de los flebótomos por sangre aviar seguida de perros y humanos (Carvalho et al., 2017).

En ambas comunidades se encontró la presencia de gallinas, perros, vacas, cabras, ovejas y caballos en muchas de las zonas peridomiciliares y zonas boscosas cercanas a las viviendas, la crianza de estos animales puede presentar un riesgo de transmisión del parásito ya que muchos de estos animales viven en cercanía con las personas y muchas de las especies de flebótomos que pueden transmitir el parásito pueden ser atraídos por la presencia de estos animales y alimentarse

de ellos y también de humanos. Muchos de estos animales podrían actuar como potenciales reservorios del parásito. En este trabajo no se encontró la presencia de ADN de perro, sin embargo, el perro ha sido definido como reservorio de especies como *Leishmania infantum/chagasi*; en el caso de las aves, se ha descrito que son refractarios a las infecciones por *Leishmania*, por lo que su presencia es un factor de riesgo que puede favorecer la presencia de flebótomos (Mejía et al., 2018).

En este trabajo se identificaron especies tanto antropofílicas como zoofílicas, sin embargo, los resultados de ADN muestran que los flebótomos antropofílicos no se alimentaron de sangre humana, lo que podría explicarse ya que, los flebótomos pueden presentar comportamientos alimenticios oportunistas en los que la preferencia del huésped puede depender de la disponibilidad y la abundancia de las fuentes alimenticias en determinada zona (Anaguano et al., 2015).

Los análisis de fuentes alimenticias son estudios importantes que contribuyen a la mejor comprensión de los hábitos alimenticios de los flebótomos en una determinada zona y pueden ayudar a establecer asociaciones entre los flebótomos y los huéspedes o reservorios involucrados en el ciclo de transmisión de la enfermedad. Los datos obtenidos en este trabajo muestran que en los flebótomos capturados en las comunidades de Las Brisas y Concepción en Pérez Zeledón durante el periodo de abril a agosto del 2021 presentaron un contacto zoofílico y no antropofílico, sin embargo, sí se detectaron especies de *Leishmania* spp en ambas localidades, por lo que la cercanía de los humanos con estos posibles reservorios es un factor de riesgo para adquirir leishmaniasis, mencionando también que existe la presencia en estas localidades de especies antropofílicas consideradas transmisoras de este parásito. En este trabajo se identificaron 15 especies de flebótomos en Pérez Zeledón, estudios realizados por Zeledón y colaboradores (1985) identificaron 4 especies en esta zona de los cuales dos de ellos se identificaron en este trabajo (*Lu. triramula* y *Lu. ylephiletor*). No se habían realizado búsquedas de infección natural de *Leishmania* spp. en flebótomos de la zona de Pérez Zeledón, en este trabajo se logró detectar *L. braziliensis* en *Lu. trapidoi* tanto en hembras no alimentadas como en hembras ingurgitadas, en Costa Rica esta especie de flebótomo es considerada como uno de los vectores principales de LC y LMC transmitiendo *L. panamensis* y *L. braziliensis* (Jaramillo-Antillón et al., 2009; 2018; Murillo & Zeledón, 1985).

Es importante realizar más estudios que puedan contribuir con más datos e información sobre los hábitos alimenticios de estos insectos y de esa manera conocer mejor el papel que tienen diferentes vertebrados en la transmisión de leishmaniasis en zonas endémicas y buscar infección natural por especies de *Leishmania* spp en flebótomos de estas zonas.

5. Conclusiones

- Se detectó infección natural de *Leishmania braziliensis* en un grupo de hembras de *Lutzomyia trapidoi* de la comunidad de Concepción reafirmando el papel que tiene esta especie en el ciclo de transmisión de la leishmaniasis.
- Las infecciones en las hembras ingurgitadas de *Lu. ovallesi* y *Lu. trapidoi* no pueden establecerse como infecciones naturales ya que el ADN del parásito podría provenir de la sangre de cabra ingurgitada por la hembra, sin embargo, si se puede establecer la circulación de *Leishmania* spp. en ambas comunidades.
- No se puede afirmar la especie de *Leishmania* detectada en el grupo de *Lu. ovallesi* ya que la región amplificada en este trabajo solo presenta similitud con secuencias de la base de datos del GenBank del 96% de *Leishmania naiffi* y del 98% con secuencias de *Leishmania* spp. sin identificar.
- El aislamiento proveniente de un grupo de *Lu. triramula* no pudo ser identificado a nivel de especie, lo cual podría indicar que se trata de una especie de *Leishmania* spp. o a una coinfección con un tripanosomátido presente en el intestino del flebótomo.
- Los análisis de las fuentes alimenticias en hembras ingurgitadas con sangre pueden confirmar que existe una preferencia alimenticia zoonótica y oportunista donde los flebótomos se alimentan de acuerdo a la disponibilidad del huésped en su entorno.

6. Recomendaciones

- Realizar la extracción de ADN de los flebótomos de manera individual y no en grupos para detectar coinfecciones entre varias especies de *Leishmania*.
- Utilizar otros marcadores moleculares con cebadores que amplifiquen zonas de mayor tamaño y con mayor especificidad que puedan discriminar entre especies *Leishmania* spp. y otros tripanosomatidos.
- Utilizar cebadores para mamíferos más específicos y variados cuando se realice el análisis de fuentes alimenticias, por ejemplo: vacas, cerdos, roedores etc.

- Aumentar los muestreos en la zona para realizar búsquedas de otras especies de *Leishmania* que se encuentren circulando, ya que podrían existir más especies causantes de leishmaniasis cutánea

7. Bibliografía

- Afonso, M. M. D. S., Duarte, R., Miranda, J. C., Caranha, L., & Rangel, E. F. (2012). Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. *Journal of Tropical Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/858657>
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), 1-40. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., ... & Sereno, D. (2017). *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular aspects of medicine*, 57, 1-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
- Anaguano, D. F., Ponce, P., Baldeón, M. E., Santander, S., & Cevallos, V. (2015). Blood-meal identification in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Valle Hermoso, a high prevalence zone for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta tropica*, 152, 116-120. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.actatropica.2015.09.004>
- Arrivillaga-Henríquez, J., Enríquez, S., Romero, V., Echeverría, G., Pérez-Barrera, J., Poveda, A., ... & Benítez, W. (2017). Aspectos ecoepidemiológicos, detección natural e identificación molecular de *Leishmania* spp. en *Lutzomyia reburra*, *Lutzomyia barrettoii majuscula* y *Lutzomyia trapidoi*. *Biomédica*, 37(2), 83-97. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3536>

- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Kobe, L.G., & Hernández-Ruiz, J. (2014). Capítulo 9: Leishmaniasis. En Becerril Flores, M. A. (Ed), *Parasitología médica* (4ta edición, pp. 85-93), McGraw-Hill/Interamericana.
- Brazil, R. P., Rodrigues, A. A. F., & Andrade Filho, J. D. (2015). Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas—a mini review. *Entomology, Ornithology & Herpetology*, 4(2), 1-4. <https://doi.org/10.4172/2161-0983.1000144>
- Cabrera, O. L., Munsterman, L. E., Cárdenas, R., Gutiérrez, R., & Ferro, C. (2002). Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of *Leishmania* DNA with PCR in phlebotomine flies. *Biomédica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 22(3), 296–302. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i3.1167>
- Campos-Fuentes, E., Castro-Castillo, A., Calvo-Fonseca, N., Mata-Somarribas, C., Prado-Porras, M. (2020). Molecular identification of species causing cutaneous *Leishmaniasis* of five endemic areas of Costa Rica through PCR-RFLP technique of the Hsp70 gene. *Revista Parasitología Latinoamericana*, 69 (2): 7-12. <https://sociedadchilenaparasitologia.cl/wp-content/uploads/2020/12/69-2-a%C3%B1o-2020-con-editorial.pdf>
- Carvalho, G. M. D. L., Rêgo, F. D., Tanure, A., Silva, A. C. P., Dias, T. A., Paz, G. F., & Andrade Filho, J. D. (2017). Bloodmeal identification in field-collected sand flies from Casa Branca, Brazil, using the cytochrome b PCR method. *Journal of Medical Entomology*, 54(4), 1049-1054. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx051>
- Ceccarelli, M., Galluzzi, L., Migliazzo, A., & Magnani, M. (2014). Detection and characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high-resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088845>
- Coughlan, S., Taylor, A. S., Feane, E., Sanders, M., Schonian, G., Cotton, J. A., & Downing, T. (2018). *Leishmania naiffi* and *Leishmania guyanensis* reference genomes highlight genome

- structure and gene evolution in the *Viannia* subgenus. *Royal Society open science*, 5(4), 172212. <https://doi.org/10.1098/rsos.172212>
- Fagundes-Silva, G. A., Romero, G. A. S., Cupolillo, E., Yamashita, E. P. G., Gomes-Silva, A., Guerra, J. A. D. O., & Da-Cruz, A. M. (2015). *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi*: rare enough to be neglected?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110, 797-800. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150128>
- Instituto Nacional de Salud [INS]. (2002). Serie de Normas técnicas: Manual de procedimientos de identificación de vectores de leishmaniosis y enfermedad de Carrión. *Ministerio de salud de Perú*. http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/1052_INS-NT36.pdf
- Jaramillo-Antillón, O., Espinoza-Aguirre, A., Calvo-Fonseca, N., Mata-Somarribas, C., & Wasserman, H. (2018). Cutaneous leishmaniasis in Costa Rica: prevention, diagnosis and treatment. *Acta Médica Costarricense*, 60(3), 103-114. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/amc/v60n3/0001-6002-amc-60-03-103.pdf>
- Jaramillo-Antillón, O., Espinoza-Aguirre, A., & Lobo-Philp, R. (2009). Estado actual de la leishmaniosis en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 51(3), 158-164. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/amc/v51n3/a07v51n3.pdf>
- Kato, H., Gomez, E. A., Seki, C., Furumoto, H., Martini-Robles, L., Muzzio, J., ... & Hashiguchi, Y. (2019). PCR-RFLP analyses of *Leishmania* species causing cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis revealed distribution of genetically complex strains with hybrid and mito-nuclear discordance in Ecuador. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007403>
- Kelly, P. H., Bahr, S. M., Serafim, T. D., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., Meneses, C., & Wilson, M. E. (2017). The gut microbiome of the vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for survival of *Leishmania infantum*. *MBio*, 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.01121-16>

- Kent, R. J., & Norris, D. E. (2005). Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 73(2), 336. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4147110/>
- Labony, S. S., Begum, N., Rima, U. K., Chowdhury, G. A., Hossain, M. Z., Habib, M. A., & Khan, M. A. H. N. A. (2014). Apply traditional and molecular protocols for the detection of carrier state of visceral leishmaniasis in black Bengal goat. *J Agric Vet Sci*, 7, 13-18. https://www.researchgate.net/profile/Mohammad-Khan-7/publication/281491346_Apply_traditional_and_molecular_protocols_for_the_detection_of_carrier_state_of_visceral_leishmaniasis_in_black_Bengal_goat/links/55eb066a08ae65b6389de109/Apply-traditional-and-molecular-protocols-for-the-detection-of-carrier-state-of-visceral-leishmaniasis-in-black-Bengal-goat.pdf
- Llanos-Cuenta, A. (2013). Capítulo 42: Leishmaniasis. En Apt-Baruch, W. (Ed). *Parasitología humana* (pp. 298-309). McGraw-Hill/Interamericana.
- Mejía, Á., Matamoros, G., Fontecha, G., & Sosa-Ochoa, W. (2018). Bionomic aspects of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis*, proven vectors of *Leishmania infantum* in an endemic area of non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras. *Parasites & vectors*, 11(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2605-7>
- Merdekios, B., Pareyn, M., Tadesse, D., Eligo, N., Kassa, M., Jacobs, B. K., ... & Cnops, L. (2021). Evaluation of conventional and four real-time PCR methods for the detection of *Leishmania* on field-collected samples in Ethiopia. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(1), <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008903>
- Murillo, J., & Zeledón, R. (1985). Brenesia. *Revista de ciencias Naturales del Museo Nacional de Costa Rica*, 1(23), 1-144
- Organización mundial de la Salud [OMS]. (2010). *Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis*, Ginebra,

22 a 26 de marzo de 2010. Serie de informes técnicos. OMS.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/82766/WHO_TRS_949_spa.pdf%3Bsequence=

Organización Panamericana de la Salud [OPS]. (2019). Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C: OPS.
https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Organización Panamericana de la Salud: Leishmaniasis [OPS]. (2020). *Leishmaniasis: Informe Epidemiológico en las Américas*. Washington, D.C: OPS/OMS.
<https://iris.paho.org/handle/10665.2/53089>

Quiroga, C., Cevallos, V., Morales, D., Baldeón, M. E., Cárdenas, P., Rojas-Silva, P., & Ponce, P. (2017). Molecular identification of *Leishmania* spp. in sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from Ecuador. *Journal of medical entomology*, 54(6), 1704-1711.
<https://doi.org/10.1093/jme/tjx122>

Rezaei, Z., Pourabbas, B., Asaei, S., Sepehrpour, S., Ahmadnia Motlagh, S., Pourabbas, P., ... & Alborzi, A. (2022). Livestock infected with *Leishmania* spp. in southern Iran. *Parasites & Vectors*, 15(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05313-8>

Rigg, C. A., Calzada, J. E., Saldaña, A., Perea, M., Chaves, L. F., & Valderrama, A. (2019). *Leishmania* spp. infection rate and feeding patterns of sand flies (Diptera: Psychodidae) from a hyperendemic cutaneous leishmaniasis community in Panamá. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 100(4), 798-807.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0628>

Rojas Madriz, B. (2019). Leishmaniasis cutánea: una revisión centrada en Costa Rica. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(2), 82-94. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-00152019000200082&script=sci_arttext

- Sandoval, C. M., Gutiérrez, R., Cárdenas, R., & Ferro, C. (2006). Especies de género *Lutzomyia* (Psychodidae, Phlebotominae) en áreas de transmisión de leishmaniasis tegumentaria y visceral en el departamento de Santander, en la cordillera oriental de los Andes colombianos. *Biomédica*, 26, 218-227. <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v26s1/v26s1a23.pdf>
- Sant'Anna, M. R., Jones, N. G., Hindley, J. A., Mendes-Sousa, A. F., Dillon, R. J., Cavalcante, R. R., ... & Bates, P. A. (2008). Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta tropica*, 107(3), 230-237. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.003>
- Sandoval, C. M., Angulo, V. M., 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), 161-8.
- Singh, N., Mishra, J., Singh, R., & Singh, S. (2013). Animal reservoirs of visceral leishmaniasis in India. *The Journal of Parasitology*, 99(1), 64-67. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-3085.1>
- Sosa-Ochoa, W., Cortedano, X. M., Argüello, S., Zuniga, C., Henríquez, J., Mejía, R., ... & Quan, D. (2014). Ecoepidemiología de la Leishmaniasis cutánea no ulcerada en Honduras. *Revista Ciencia y Tecnología*, 115-128. <https://www.researchgate.net/publication/272376812>
- Taslimi, Y., Zahedifard, F., & Rafati, S. (2018). Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology*, 145 (4), 1-11. <https://doi.org/10.1017/S003118201600216X>
- Tanure, A., Rego, F. D., Tonelli, G. B., Campos, A. M., Shimabukuro, P. H. F., Gontijo, C. M. F., ... & Andrade-Filho, J. D. (2020). Diversity of phlebotomine sand flies and molecular detection of trypanosomatids in Brumadinho, Minas Gerais, Brazil. *PloS one*, 15(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234445>

- Valdivia, H. O., De Los Santos, M. B., Fernandez, R., Baldeviano, G. C., Zorrilla, V. O., Vera, H., Lucas, C. M., Edgel, K. A., Lescano, A. G., Mundal, K. D., & Graf, P. C. F. (2012). Natural Leishmania infection of Lutzomyia auraensis in Madre de Dios, Peru, detected by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(3), 511–517. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0708>
- 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). *American Entomological Institute* (54), 1-887.
- Williams, A. O., Mutinga, J., & Rodgers, M. (1991). Leishmaniasis in a domestic goat in Kenya. *Molecular and cellular probes*, 5(5), 319-325. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0890850806800022>

Discusión General

En Costa Rica se ha reportado a *Lu. ylephiletor* y *Lu. trapidoi* como los vectores en la transmisión de *Leishmania panamensis* y *Leishmania braziliensis*, principales causantes de leishmaniasis cutánea y mucocutánea respectivamente en el país. En la primera parte de este trabajo se identificaron 15 especies de flebótomos de las cuales, dos ya habían sido reportadas por Zeledón

y Murillo en el cantón de Pérez Zeledón (Murillo & Zeledón, 1985). La especie que se identificó con mayor proporción fue *Lu. triramula* (48.2%), la cual es una especie que no presenta importancia a nivel clínico debido a que no presenta hábitos antropofílicos pero que puede tener un papel en el ciclo silvestre al tener contacto con animales silvestres que pueden actuar como reservorios o como reservorios potenciales (Martínez et al., 2019; Rigg et al., 2019). Entre las especies identificadas se encuentran *Lu. ylephiletor* (5.7%) y *Lu. trapidoi* (1.4%) en las dos localidades muestreadas, además de otras especies que han sido incriminadas como vectores en otros países como es el caso de *Lu. panamensis* (4.6%), *Lu. ovallesi* (1.1%), *Lu. cruciata* (19.1%) y *Lu. youngi* (3.2%) además de especies con potencial vectorial como *Lu. serrana*, *Lu. sanguinaria* y *Lu. carrerai thula*, la presencia de estas especies representa un factor de riesgo para adquirir leishmaniasis en estas localidades.

Se encontró que existe una similitud del 53% ($I_j=0.53$) en ambas localidades, encontrándose ocho especies en común, entre ellas: *Lu. ylephiletor* y *Lu. trapidoi*. Las diferencias entre ambas comunidades se ven reflejadas en la riqueza y la abundancia de las especies en cada localidad. En este estudio, Concepción presentó mayor equidad y riqueza de especies, identificándose 14/15 especies, esta localidad presenta mayor vegetación con menos intervenciones por parte del hombre siendo una comunidad menos urbanizada con zonas de cultivo y cría de animales, debido a esto la presencia de los flebótomos fue mayor, mientras que en la localidad de Las Brisas se identificaron 9/15 especies, presentando mayor urbanización con zonas boscosas, pero en menor cantidad si comparamos con Concepción. La presencia de flebótomos se encuentra relacionada con la cercanía que existe con el contacto humano en las viviendas o en zonas boscosas, muchos de ellos se acercan a las zonas domiciliarias atraídos por la presencia de animales por lo que se considera un factor de riesgo la presencia de ellos en las viviendas ya que, podrían actuar como reservorios potenciales del parásito (Martínez et al., 2019; Osorio, 2015; Sandoval et al., 1998).

En la segunda parte de este trabajo se detectó la presencia de *Leishmania braziliensis* en ambas comunidades. En Concepción se detectó en un grupo de *Lu. trapidoi* donde la secuencia obtenida presentó una similitud del 100% con secuencias de la base de datos de GenBank (Cod. de acceso: KP274863.1), mientras que en Las Brisas se detectó en una hembra ingurgitada de *Lu. trapidoi* con una similitud del 100% de acuerdo a GenBank (Cod. de acceso: KP274863.1). La detección en Las Brisas no puede establecerse como una infección natural ya que se trataba de una hembra

ingurgitada con sangre de cabra por lo que la presencia del parásito podría provenir de la sangre ingurgitada. Estos resultados concuerdan con el estudio de Campos-Fuentes (2020) en el cual se identificó la presencia de *L. braziliensis* en pacientes con leishmaniasis cutánea provenientes de Pérez Zeledón (Campos-Fuentes et al., 2020).

En una hembra ingurgitada de *Lu. ovallesi* proveniente de Concepción y en un grupo de *Lu. triramula* se detectó la presencia de *Leishmania* spp. La secuencia obtenida de *Lu. ovallesi* presentó una similitud de 98% con aislamientos de *Leishmania* spp. que no pudieron ser identificados a nivel de especie (Cod. de acceso en GenBank: MN638732.1, MN759037.1, MN638737.1), sin embargo, la secuencia también presentó una similitud del 96% con *Leishmania naiffi* (Cod. de acceso: DQ182543.1), tomando en cuenta la similitud que tuvo el aislamiento con otras especies de *Leishmania*, no se pudo confirmar la especie, tampoco se puede establecer si se trataba de una infección natural en *Lu. ovallesi* ya que se trataba de una hembra ingurgitada con sangre de cabra. En países como Venezuela y Colombia este flebótomo ha sido incriminado como vector de *L. braziliensis* y de *L. mexicana* en Guatemala (Vargas & Úsuga, 2022; OPS, 2019; Sandoval et al., 1998; 2006). En el caso de *Lu. triramula*, no es una especie de interés epidemiológico ya que es una especie zoofílica por lo que su importancia es taxonómica, sin embargo, en estudios realizados en Panamá se menciona el potencial que posee esta especie en el ciclo de transmisión ya que se ha encontrado infectado con especies de *Leishmania* (Rigg et al., 2019), en este trabajo la secuencia obtenida de un grupo de esta especie tuvo un 97% de similitud con secuencias de *Leishmania* spp. en GenBank (Cod. de acceso: MN638732.1, MN638737.1, MN759037.1). Los aislamientos de *Lu. ovallesi* y de *Lu. triramula* se reportaron como *Leishmania* spp.

Los flebótomos identificados en este trabajo presentaron una preferencia por sangre aviar, seguida de sangre de mamífero, sin embargo, no se detectó ADN de humano. Aunque la mayoría de las especies ingurgitadas eran especies antropofílicas, se observó un comportamiento zoofílico; hay flebótomos que pueden presentar comportamientos alimenticios oportunistas por lo que estarán sujetos a la disponibilidad y a la abundancia de las fuentes alimenticias en una zona determinada (Anaguano et al., 2015). Los resultados de las fuentes alimenticias obtenidos en este trabajo concuerdan con otros estudios donde se ha reportado la afinidad que tienen los flebótomos por la sangre aviar como una fuente de alimento, dado que la sangre de ave fue la principal fuente

alimenticia detectada en este trabajo (Sant'Anna et al., 2008; Afonso et al., 2012; Anaguano et al., 2015). La presencia de animales en las viviendas especialmente en zonas endémicas de leishmaniasis representa un factor de riesgo ya que muchos flebótomos se ven atraídos por su presencia. En ambas comunidades se observó la presencia de gallinas, perros, vacas, cabras, ovejas y caballos habitando a los alrededores de las viviendas. Muchos de estos animales pueden actuar como potenciales reservorios del parásito. Aunque las aves han sido descritas como refractarias ante infecciones por *Leishmania* spp., su presencia sigue representando un factor de riesgo para atraer flebótomos a las viviendas (Carvalho et al., 2017; Mejía et al., 2018).

Bibliografía

- Afonso, M. M. D. S., Duarte, R., Miranda, J. C., Caranha, L., & Rangel, E. F. (2012). Studies on the feeding habits of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. *Journal of Tropical Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/858657>
- Anaguano, D. F., Ponce, P., Baldeón, M. E., Santander, S., & Cevallos, V. (2015). Blood-meal identification in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Valle Hermoso, a high prevalence zone for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta tropica*, 152, 116-120. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.actatropica.2015.09.004>
- Campos-Fuentes, E., Castro-Castillo, A., Calvo-Fonseca, N., Mata-Somarribas, C., Prado-Porras, M. (2020). Molecular identification of species causing cutaneous *Leishmaniasis* of five endemic areas of Costa Rica through PCR-RFLP technique of the Hsp70 gene. *Revista Parasitología Latinoamericana*, 69 (2): 7-12. <https://sociedadchilenaparasitologia.cl/wp-content/uploads/2020/12/69-2-a%C3%B1o-2020-con-editorial.pdf>
- Carvalho, G. M. D. L., Rêgo, F. D., Tanure, A., Silva, A. C. P., Dias, T. A., Paz, G. F., & Andrade Filho, J. D. (2017). Bloodmeal identification in field-collected sand flies from Casa Branca, Brazil, using the cytochrome b PCR method. *Journal of Medical Entomology*, 54(4), 1049-1054. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx051>

- Martínez, D. C., Ávila, J. L., & Molano, F. (2019). Flebótomos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), presentes en una zona endémica de leishmaniasis cutánea en el occidente de Boyacá, Colombia. *Colombia Médica*, 50(3), 192-200.
- Mejía, Á., Matamoros, G., Fontecha, G., & Sosa-Ochoa, W. (2018). Bionomic aspects of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis*, proven vectors of *Leishmania infantum* in an endemic area of non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras. *Parasites & vectors*, 11(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2605-7>
- Murillo, J., & Zeledón, R. (1985). Brenesia. *Revista de ciencias Naturales del Museo Nacional de Costa Rica*, 1(23), 1-144
- Osorio, A. R. (2015). Diversidad de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) en localidades de la Región Fronteriza de Chiapas, México (Doctoral dissertation, *INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA*). <https://catalogoinsp.mx/files/tes/054839.pdf>
- Rigg, C. A., Calzada, J. E., Saldaña, A., Perea, M., Chaves, L. F., & Valderrama, A. (2019). *Leishmania* spp. infection rate and feeding patterns of sand flies (Diptera: Psychodidae) from a hyperendemic cutaneous leishmaniasis community in Panamá. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 100(4), 798-807. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0628>
- Sandoval, C. M., Gutiérrez, R., Cárdenas, R., & Ferro, C. (2006). Especies de género *Lutzomyia* (Psychodidae, Phlebotominae) en áreas de transmisión de leishmaniasis tegumentaria y visceral en el departamento de Santander, en la cordillera oriental de los Andes colombianos. *Biomédica*, 26, 218-227. <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v26s1/v26s1a23.pdf>
- Sandoval, C. M., Angulo, V. M., 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), 161-8. <https://revistasoj.s.ucaldas.edu.co/index.php/boletincientifico/article/view/6885/6218>

Sant'Anna, M. R., Jones, N. G., Hindley, J. A., Mendes-Sousa, A. F., Dillon, R. J., Cavalcante, R. R., ... & Bates, P. A. (2008). Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta tropica*, 107(3), 230-237. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.003>

Vargas, W. G., & Úsuga, G. Z. (2022). Especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) en el área de influencia de la Central Hidroeléctrica Sogamoso (Santander, Colombia). *Boletín Científico. Centro de Museos*, 26(1), 121-133. <https://revistasoj.s.ucaldas.edu.co/index.php/boletincientifico/article/view/6885/6218>

Conclusiones Generales

- Las localidades de Las Brisas y Concepción presentan zonas boscosas que favorecen la presencia de abundantes especies de flebotominos, sin embargo, Concepción presenta zonas con menor alteración en su vegetación siendo menos urbanizada que Las Brisas por lo cual se recolectaron mayores cantidades de flebótomos y fue la localidad que presentó índices de diversidad más altos.
- En ambas localidades se identificaron especies de importancia epidemiológica como *Lutzomyia ylephiletor* y *Lu. trapidoi* las cuales son los transmisores de leishmaniasis en Costa Rica, además de otras especies incriminadas como vectores en otros países y que poseen potencial vectorial como *Lutzomyia cruciata*, *Lutzomyia panamensis* y *Lutzomyia ovalessi* *Lutzomyia youngi* y *Lutzomyia serrana*, lo cual representa un factor de riesgo para adquirir la enfermedad en esta zona.
- La detección de *Leishmania braziliensis* en una hembra ingurgitada de Las Brisas y en un grupo de *Lutzomyia trapidoi* proveniente de Concepción indica que esta especie se encuentra circulando en estas localidades.
- Los aislamientos de *Leishmania* spp. en un grupo de *Lutzomyia triramula* y en una hembra ingurgitada de *Lutzomyia ovallesi* detectados en este trabajo no pudieron identificarse a nivel de especie debido a la similitud de la región amplificada con diferentes secuencias de *Leishmania* spp. guardadas en la base de GenBank sin embargo, estos aislamientos indican

que existe la posibilidad que existan otras especies de *Leishmania* circulando en ambas comunidades.

- Los resultados obtenidos en este trabajo del análisis de fuentes alimenticias indican que en los flebótomos recolectados en las comunidades de Las Brisas y Concepción existe una preferencia alimenticia zoofílica u oportunista ya que se encontró una predominancia de sangre de animales y no se detectó ADN de humano.

Recomendaciones Generales

- Realizar más muestreos en Pérez Zeledón para tener más información si existen más especies de flebótomos que podrían ser vectores potenciales de leishmaniasis además de buscar si existen otras especies de *Leishmania*.
- Realizar los análisis moleculares de manera individual y no por grupos comenzando desde la extracción de ADN, ya que puede existir el caso de infecciones mixtas entre varias especies de *Leishmania* o con otros flagelados.
- Utilizar marcadores moleculares con cebadores que amplifiquen zonas de mayor tamaño y con mayor especificidad que puedan discriminar entre especies *Leishmania* spp. y otros tripanosomatidos.
- Utilizar cebadores más específicos para mamíferos cuando se realice la determinación de fuentes alimenticias para tener mayor especificidad, por ejemplo: cebadores para ADN de vacas, cerdos, roedores, ovejas, cabras etc

Anexos

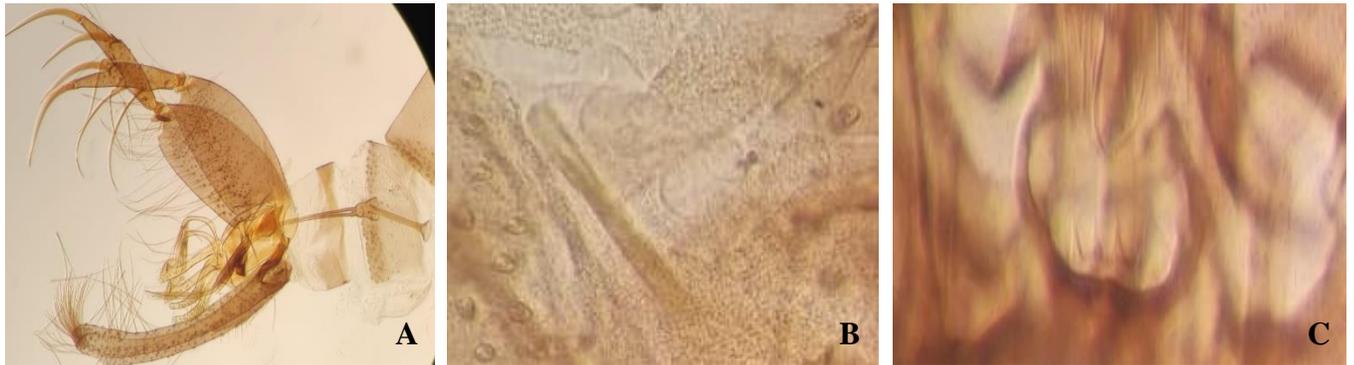


Figura 1: *Lutzomyia triramula*. **A:** genitalia masculina, **B:** espermateca femenina, **C:** cibario

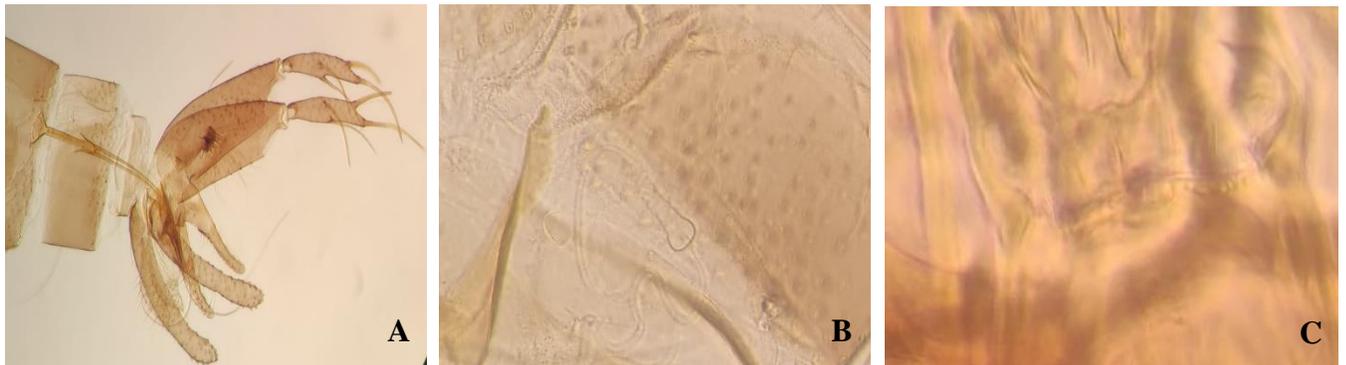


Figura 2: *Lutzomyia cruciata*. **A:** genitalia masculina, **B:** espermateca femenina, **C:** cibario



Figura 3: *Lutzomyia serrana*. **A:** genitalia masculina, **B:** espermateca femenina, **C:** cibario



Figura 4: *Lutzomyia ylephiletor*. **A:** genitalia masculina, **B:** espermateca femenina, **C:** cibario

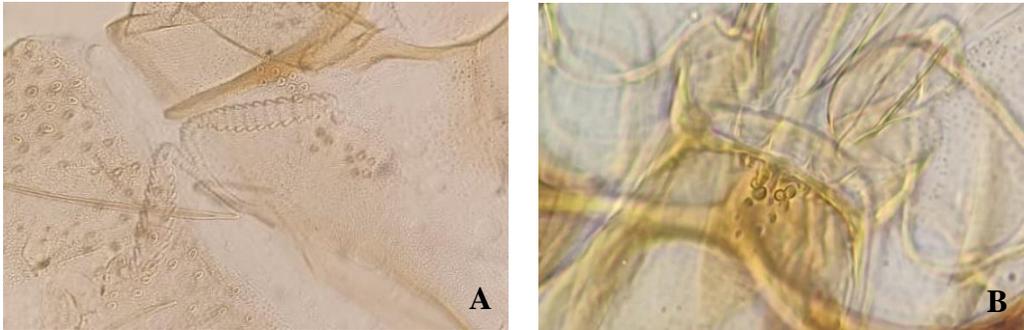


Figura 5: *Lutzomyia panamensis*. **A:** espermateca femenina, **B:** cibario

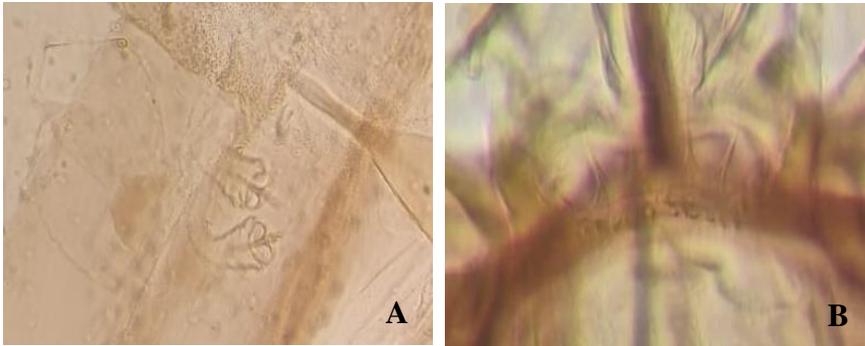


Figura 6: *Lutzomyia youngi*. **A:** espermateca femenina, **B:** cibari



Figura 7: *Lutzomyia runoides*. **A:** genitalia masculina, **B:** espermateca femenina, **C:** cibario

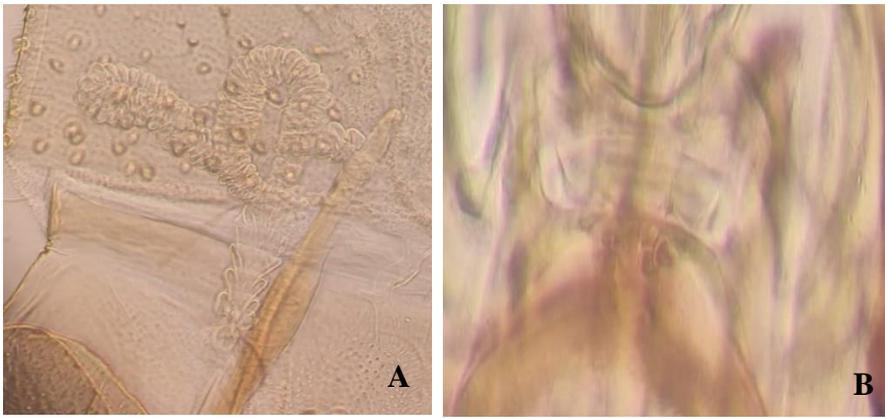


Figura 8: *Lutzomyia geniculata*. **A:** espermateca femenina, **B:** cibario



Figura 9: *Lutzomyia carrerai thula*. **A:** genitalia masculina, **B:** espermateca femenina, **C:** cibario



Figura 10: *Brumptomyia* sp. **A:** espermateca femenina, **B:** cibario

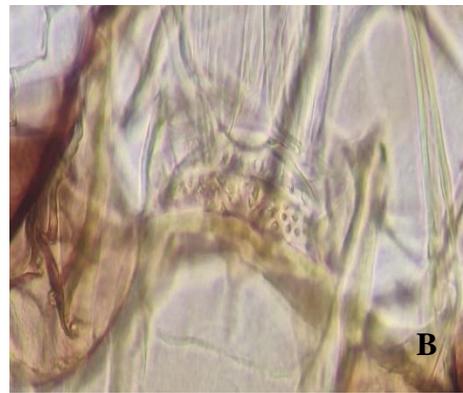


Figura 11: *Lutzomyia trapidoi*. **A:** espermateca femenina, **B:** cibario



Figura 12: *Lutzomyia ovallesi*. **A:** espermateca femenina, **B:** cibario

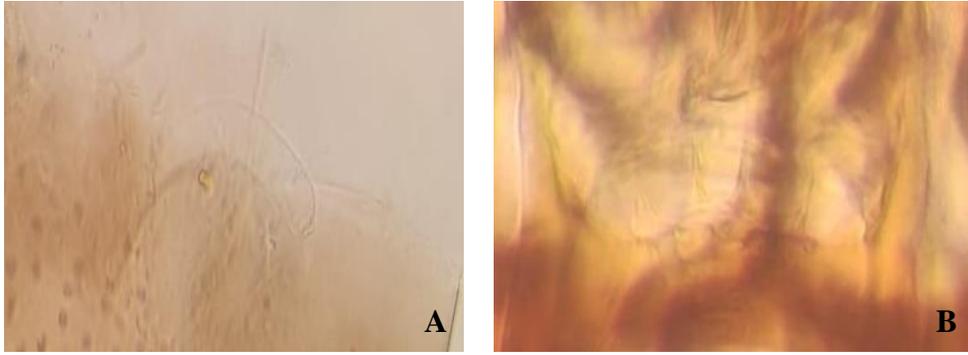


Figura 13: *Lutzomyia sanguinaria*. **A:** espermateca femenina, **B:** cibario

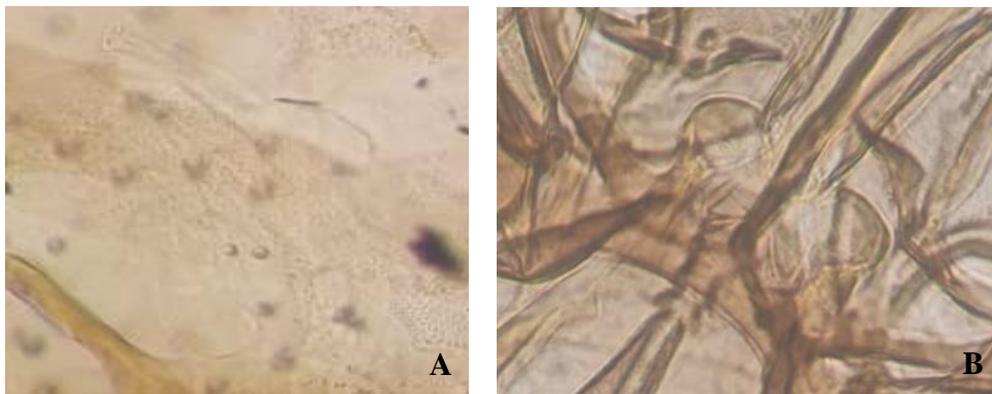


Figura 14: *Lutzomyia sordellii*. **A:** espermateca femenina, **B:** cibario

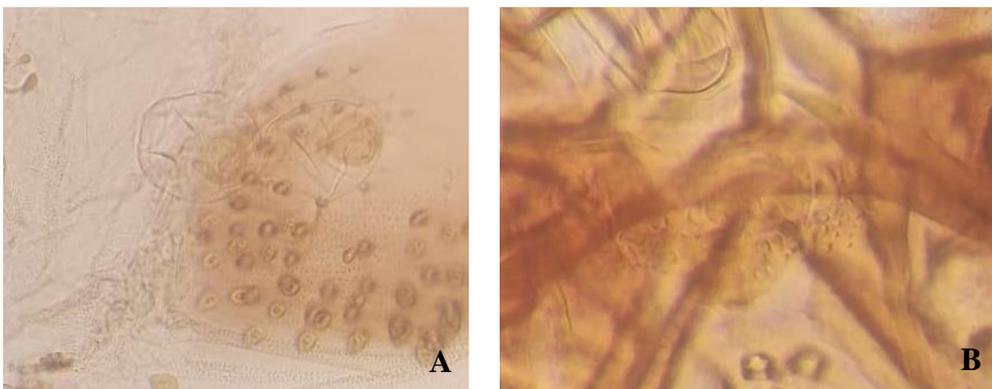


Figura 15: *Lutzomyia barrettoii majuscula*. **A:** espermateca femenina, **B:** cibario