

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**



**Caracterización eco-epidemiológica de un brote de leishmaniasis visceral en el corregimiento Sabanas de la Negra, municipio de Sampedra, Sucre**

**Daniel Alberto Guzmán Vásquez**

**Universidad de Córdoba**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Maestría en Microbiología tropical**

**Montería, Colombia**

**2020**

**Caracterización eco-epidemiológica de un brote de leishmaniasis visceral en el  
corregimiento Sabanas de la Negra, municipio de Sampués, Sucre**

**Daniel Alberto Guzmán Vásquez**

**Tesis presentada como requisito para optar el título de:**

**Magíster en Microbiología tropical**

**Director**

**Alveiro José Pérez Doria, M. Sc**

**Codirector**

**Eduar Elías Bejarano Martínez, M. Sc., PhD.**

**Universidad de Córdoba**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Maestría en Microbiología tropical**

**Montería, Colombia**

**2020**

## **DEDICATORIA**

Esta obra, la dedico a mi padre, Santiago Guzmán y a la memoria de mi madre Luz María Vásquez, quienes con sus consejos me han guiado todo el tiempo y alentaron para continuar, cuando parecía que me iba a rendir, asimismo, a mis hermanos, Patricia Guzmán y Santiago Guzmán (Jr.) por apoyarme en este deseo por escalar otro peldaño en la vida.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios

A mi director de tesis, Alveiro José Pérez Doria, por darme la oportunidad de aprender bajo su guía.

Al Dr. Eduar Elías Bejarano, por su valiosa asesoría y aporte para la realización de este proyecto de investigación.

A mi confidente Hernando Cárdenas, por acompañarme en esta travesía con paciencia e incondicionalidad.

A mis compañeros del grupo de investigaciones Biomédica, Lina Martínez, Wendy Zabala, Maira Aleman, Carlos Sermeño, Oscar Pérez y Wilmer Mejía, quienes fueron un gran apoyo en la generación de conocimiento y al mismo tiempo, contribuyeron a que mi tiempo en el laboratorio y en campo fuera muy agradable.

A la investigadora Matilde Rivero, por su tiempo y disposición para compartir conmigo parte de su conocimiento.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. Leishmaniasis en el mundo y en Colombia</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2. Agente etiológico de la leishmaniasis</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3. Taxonomía de parásitos del género <i>Leishmania</i></b> .....	<b>8</b>
<b>2.4. Vectores de leishmaniasis</b> .....	<b>13</b>
<b>2.5. Reservorios de <i>Leishmania</i> spp.</b> .....	<b>14</b>
<b>2.6. Fuentes de ingesta de flebotomíneos</b> .....	<b>16</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1. General</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2. Específicos</b> .....	<b>20</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>21</b>
<b>5.1. Área de estudio</b> .....	<b>21</b>
<b>5.2. Tipo de estudio</b> .....	<b>22</b>
<b>5.3. Determinación de la diversidad y actividad nocturna de los flebotomíneos</b> .....	<b>23</b>
5.3.1. Captura de flebotomíneos. ....	23
5.3.2. Determinación taxonómica de flebotomíneos. ....	24

<b>5.4. Determinación de la frecuencia de uso de animales vertebrados como fuentes de ingesta sanguínea para los flebotomíneos. ....</b>	<b>25</b>
5.4.1. Extracción de ADN a partir de muestras de flebotomíneos.....	25
5.4.2. PCR múltiple del gen Cyt B para la identificación de las fuentes de ingesta de los insectos flebotomíneos del género <i>Lutzomyia</i> . ....	26
<b>5.5. Determinación de la prevalencia de anticuerpos frente a <i>Leishmania</i> spp. en animales domésticos, sinantrópicos y silvestres. ....</b>	<b>27</b>
5.5.1. Captura de animales domésticos y recolección de muestras .....	27
5.5.2. Trampeo y manejo de roedores .....	28
5.5.3. Obtención de sangre de los roedores capturados .....	28
5.5.4. Captura de animales silvestres y recolección de muestras. ....	29
5.5.5. Detección de anticuerpos IgG contra <i>Leishmania</i> spp. por inmunofluorescencia indirecta (IFI). ....	29
<b>5.6. Identificación genética las especies de parásitos tripanosomátidos a partir de muestra sanguínea de mamíferos y flebotomíneos no ingurgitados.....</b>	<b>31</b>
5.6.1. Amplificación de la región conservada del minicírculo del kinetoplasto de los parásitos tripanosomátidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ....	31
5.6.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa .....	32
5.6.3. Caracterización genética de los parásitos tripanosomátidos mediante secuenciación y análisis filogenético de la región conservada de los minicírculo del Kinetoplasto. ....	32
<b>5.7. Estimación de frecuencia de infección con <i>Leishmania</i> spp. en vertebrados y flebotomíneos. ....</b>	<b>33</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>6.1. Determinación de la diversidad y la actividad nocturna de los flebotomíneos del género <i>Lutzomyia</i>, asociados a la aparición del primer brote de leishmaniasis visceral en Sabanas de La Negra, área rural del municipio de Sampués.....</b>	<b>34</b>
6.1.1. Diversidad de los flebotomíneos del género <i>Lutzomyia</i> . ....	35
6.1.2. Determinación de la actividad nocturna de los flebotomíneos del género <i>Lutzomyia</i> . ....	37

<b>6.2. Determinación de la frecuencia de uso de vertebrados como fuentes de ingesta sanguínea para los flebotomíneos.</b>	<b>40</b>
<b>6.3. Determinación de la prevalencia de anticuerpos frente a <i>Leishmania</i> spp. en animales domésticos, sinantrópicos y silvestres.</b>	<b>41</b>
6.3.1. Detección de anticuerpos IgG contra <i>Leishmania</i> spp. por inmunofluorescencia indirecta (IFI).	42
<b>6.4. Identificación genética las especies de parásitos tripanosomatídeos a partir de muestra sanguínea de mamíferos y flebotomíneos no ingurgitados.</b>	<b>44</b>
6.4.1. Amplificación de la región conservada del minicirculo del kinetoplasto de los parásitos tripanosomatídeos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	44
6.4.2. Caracterización genética de los parásitos tripanosomatídeos mediante secuenciación y análisis filogenético de la región conservada de los minicirculo del Kinetoplasto.	46
<b>6.5. Estimación de frecuencia de infección con <i>Leishmania</i> spp. en vertebrados y flebotomíneos.</b>	<b>49</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>RECOMENDACIÓN</b>	<b>67</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>68</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>89</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. en el vertebrado y en el flebotomíneo .....	8
Figura 2. Clasificación taxonómica del género <i>Leishmania</i> .....	10
Figura 3. Caracteres anatómicos externos de <i>Lutzomyia</i> spp. (Daniel Guzmán).....	13
Figura 4. Municipio de Sampedra y sus corregimientos .....	22
Figura 5. Corregimiento Sabanas de La Negra y área de muestreo de mamíferos. ....	34
Figura 6. Espermatecas de las especies del género <i>Lutzomyia</i> presentes en Sabanas de La Negra, Sampedra.....	35
Figura 7. Flebotomíneos en relación al área de muestreo, el sexo y estado de ingesta sanguínea. ....	37
Figura 8. Número de flebotomíneos hembra de acuerdo a la hora y lugar muestreado. ....	38
Figura 9. Actividad nocturna de <i>Lu. evansi</i> en relación al área de captura. ....	38
Figura 10. Promedio de la variación de la temperatura, la humedad relativa y la abundancia de los flebotomíneos según hora de captura.....	39
Figura 11. Especies de mamíferos muestreados en Sabanas de La Negra, Sampedra (A) <i>Bradypus variegatus</i> ; (B) <i>Didelphis marsupialis</i> ; (C) <i>Zygodontomys brevicauda</i> ; (D) <i>Rattus rattus</i> ; (E) <i>Canis familiaris</i> ; (F) <i>Equus asinus</i> y (G) <i>Bos indicus</i> . (Daniel Guzmán) .....	42
Figura 12. Interpretación de la IFI contra IgG anti- <i>Leishmania</i> y Anti- <i>Trypanosoma</i> spp.....	43
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa del ADNk de tripanosomatídeos.....	45
Figura 14. Análisis filogenético de la región conservada del minicírculo del kinetoplasto de las especies del género <i>Leishmania</i> .....	47

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los cebadores usados en la PCR múltiple para detección de fuentes de ingesta sanguínea.....	27
Tabla 2. Fauna flebotomínea del corregimiento Sabanas de la Negra, muestreada con trampas tipo CDC. ....	36
Tabla 3. Frecuencia de uso de cinco especies de animales domésticos como fuente de ingesta sanguínea.....	40
Tabla 4. Prevalencia de anticuerpos frente a <i>Leishmania</i> spp. y <i>Trypanosoma</i> spp., detectados mediante IFI a una dilución de suero de 1/32 en mamíferos muestreados en Sabanas de La Negra, Sampués. ....	43
Tabla 5. Mamíferos seropositivos para anticuerpos contra <i>Leishmania</i> spp. y <i>Trypanosoma</i> spp. ....	43
Tabla 6. Especies de flebotomíneos y resultados de PCR de los minicírculos de kinetoplasto con el propósito de detectar parásitos del género <i>Leishmania</i> . ....	45
Tabla 7. Códigos asignados por GenBank a los fragmentos de la región conservada de los minicírculos del kinetoplasto de <i>Le. infantum</i> junto con sus hospederos. ....	48
Tabla 8. Frecuencia mínima de infección con <i>Le. infantum</i> en flebotomíneos de Sampués. ....	49
Tabla 9. Frecuencia de infección con <i>Le. infantum</i> en mamíferos de Sampués. ....	49

## RESUMEN

La leishmaniasis en Colombia es considerada un problema de Salud Pública, con un promedio anual de 8.700 casos informados (2016-2018). En la Costa Caribe de Colombia se encuentra el segundo macrofoco de leishmaniasis visceral (LV) más importante del país, y dentro de esta región, el departamento de Sucre, ocupó el segundo lugar en número de casos de esta enfermedad en el periodo 2008 a 2019; aunque se tiene una visión global de los actores que participan en el mantenimiento del ciclo epidemiológico de la leishmaniasis en el macrofoco, sus determinantes epidemiológicos varían en cada microfoco, lo que motivó el interés por conocer la identidad de los parásitos, vectores y reservorios asociados a un nuevo brote de leishmaniasis visceral registrado en el 2016 en el corregimiento Sabanas de la Negra, en el municipio de Sampués, Sucre.

Los flebotomíneos se capturaron con trampas de luz emitida por diodos tipo Unisucre, estos fueron identificados taxonómicamente y se les extrajo el ADN para hacer la detección de parásitos del género *Leishmania* mediante PCR del minicírculo, además, a los flebotomíneos con ingesta sanguínea se les determinó la frecuencia de uso de vertebrados como fuentes de sangre, mediante la amplificación diferencial del gen citocromo b (Cyt b) por PCR Múltiple. Los vertebrados silvestres (roedores, zarigüeyas, perezosos) fueron capturados con trampas Sherman, Tomahawk y búsqueda directa; los animales domésticos (caninos, equinos, bovinos) fueron capturados con ayuda de sus dueños, previo consentimiento informado. A cada animal se le tomó una muestra de sangre, para detección de anticuerpos contra *Leishmania* spp., mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y para la detección del ADN de los parásitos, que posteriormente fueron identificados con base en la secuencia de los amplicones de la región conservada del minicírculo.

La determinación de la fuente sanguínea en flebotomíneos alimentados, detectó en *Lu. evansi* material genético de *Bos taurus* en un 57.14 % (4/7) y de *Capra hircus* en un 14.28% (1/7); paralelamente, en el 28.57% (2/7) de *Lu. evansi* se identificó ingesta mixta: 14.28% (1/7) *Bos taurus* con *canis familiaris* y 14.28% (1/7) de *B. taurus* con *C. hircus*; del mismo modo, en *Lu. gomezi* fue detectado el uso de *B. taurus* (1/1) como fuente de alimento. Por otro lado, a partir de los ensayos serológicos (IFI) se obtuvo una sero-positividad del 50% (n:2/4) en caninos, del 50% (2/4) en equinos y del 9.09% (1/9) en roedores. A partir de los análisis filogenéticos se determinó que *Leishmania infantum* es la especie infectante en los flebotomíneos y mamíferos, con una frecuencia mínima de infección de 3.2% (n:5/158) en *Lutzomyia evansi*, 22.7% (n:5/22) en *Lu. panamensis*, 21.4% (n:3/14) en *Lu. cayennensis cayennensis*, 66.6% (n:4/6) en *Lu. gomezi*, y en *Lu. dubitans* y en *Lu. rangelliana* se encontró un individuo infectado (n:1/2) de forma similar; la prevalencia de infección en roedores fue de 18,2% (n: 2/11), en zarigüeyas 22,2% (n:2/9), en caninos, equinos y bovinos fue del 50% (2/4) en cada uno y del 100% (2/2) en osos perezosos. Estos resultados son concordantes con los registros e historiales epidemiológicos que presentan los flebotomíneos y vertebrados como vectores y reservorios de *Leishmania* spp., en el país y con base en esto se generó la evidencia necesaria para concluir que en el brote estudiado de LV, existió un ciclo de transmisión doméstico rural, que involucra a *Lu. evansi*, *Lu. panamensis* y *Lu. gomezi* como potenciales vectores, y a mamíferos domésticos, sinantrópicos y silvestres que actuarían como potenciales reservorios, por tanto, se recomienda desarrollar programas de educación, prevención y control de la enfermedad para evitar que este brote se convierta en un nuevo foco de la enfermedad.

## ABSTRACT

Leishmaniasis in Colombia is considered a Public Health problem, with 8,700 cases annually, on average (2016-2018). On the Caribbean coast of Colombia is located the second most important foci of visceral leishmaniasis. In this region, the Departamento of Sucre (equivalent to estate) shows the second highest number of cases of this disease from 2008 to 2019; Although we have a global vision of the epidemiological cycle of this disease, its epidemiological determinants vary in each focus, motivating our interest by identifying the parasites that infected sandflies and vertebrates associated with a new outbreak of visceral leishmaniasis registered in 2016 in Sabanas de la Negra, rural area the township of Sampués, Sucre.

Sandflies were captured with light traps emitted by Unisucre-type diodes, these were taxonomically identified and DNA was extracted to detect parasites of the genus *Leishmania* by PCR of the minicircle. In addition, were determined the frequency of use of vertebrates as a sources of blood, by differential amplification of the cytochrome b (Cyt b) gene by Multiple PCR in phlebotomines that presented blood meal in the digestive tract. Wild vertebrates (rodents, possums, sloths) were caught with Sherman traps, Tomahawk and direct search; domestic animals (canines, equines, bovines) were captured with the help of their owners, with prior informed consent. A blood sample was taken from each animal, for the detection of antibodies against *Leishmania* spp., by indirect immunofluorescence (IFAT) and for the detection of the DNA of the parasites, which were subsequently identified based on the sequence of the amplicons of the conserved region of the minicircle.

The determination of the blood source in fed phlebotomines, detected in *Lu. evansi* genetic material of *Bos taurus* in 57.14% (4/7) and *Capro hircus* in 14.28% (1/7); in parallel, in 28.57% (2/7) of *Lu. evansi* mixed intake was identified: 14.28% (1/7) *Bos taurus* with *canis familiaris* and 14.28% (1/7) *B. taurus* with *C. hircus*; similarly, in *Lu. Gomez* detected the use of *B. taurus* (1/1) as a food source. On the other hand, from serological tests (IFAT) a sero-positivity of 50% (n: 2/4) was obtained in canines, 50% (2/4) in equines and 9.09% (1/9) in rodents. From the phylogenetic analyzes it was determined that *Leishmania infantum* is the infecting species in sandflies and mammals, with a minimum infection frequency of 3.2% (n: 5/158) in *Lutzomyia evansi*, 22.7% (n: 5/22) in *Lu. panamensis*, 21.4% (n: 3/14) in *Lu. cayennensis cayennensis*, 66.6% (n: 4/6) in *Lu. gomezi*, and in *Lu. dubitans* and in *Lu. rangeliana* an infected individual (n: 1/2) was found in a similar way; the prevalence of infection in rodents was 18.2% (n: 2/11), in opossums 22.2% (n: 2/9), in canines, equines and bovines it was 50% (2/4) in each and 100% (2/2) in the sloths. Our results allow us to conclude that, in the studied outbreak, is occurring a rural domestic transmission cycle that involves *Lu. evansi*, *Lu. panamensis* and *Lu. gomezi*, as vectors, and domestic, synanthropic, and wild animals that would act as potential reservoirs. Therefore, education and prevention program disease control will be developed to prevent this outbreak from becoming a new focus of the disease.

## INTRODUCCIÓN

En las Américas, las leishmaniasis son enfermedades zoonóticas que causan en el humano, un conjunto de síndromes clínicos, que pueden comprometer la piel, las mucosas y las vísceras. Son causadas por especies de protozoos del género *Leishmania* y se transmiten a los animales y humanos a través de la picadura de insectos de la familia Psychodidae, principalmente los agrupados en el género *Lutzomyia* (Organización Panamericana de la Salud, 2019b). Las presentaciones clínicas varían de acuerdo con la especie parasitaria, la respuesta inmune del hospedero y la evolución de la enfermedad, e incluye: leishmaniasis cutánea (LC) con lesiones en la piel, leishmaniasis mucosa (LM) que genera destrucción parcial o total de tejidos nasofaríngeos y la forma más grave de la enfermedad que es la leishmaniasis visceral (LV), que afecta principalmente órganos del sistema reticuloendotelial, cuando no es diagnosticada y tratada oportunamente, pueden llevar a la muerte a menores de 5 años y adultos con algún inmunocompromiso (Instituto Nacional de Salud, 2017, 2018a; Jiménez, 2015; OMS, 2017; Organización Panamericana de la Salud, 2019b).

La leishmaniasis es considerada como un problema de Salud Pública en Colombia, no solo por las cifras registradas en los focos históricos, donde la enfermedad es endémica, sino también, por la aparición de nuevos focos en áreas rurales y áreas urbanas; en estas últimas se ha descrito domiciliación del vector y transmisión doméstica del patógeno, con casos frecuentes en estudiantes escolares y amas de casa (Instituto Nacional de Salud, 2018b). En 2018 la incidencia general nacional de leishmaniasis fue de 68 casos por 100.000 habitantes en riesgo, mientras que la incidencia de la forma visceral fue de 0.2 casos por 100.000 habitantes en riesgo, con una letalidad de 6.3% (Instituto Nacional de Salud, 2018b).

Colombia se le ha catalogado como el país con más diversidad de parásitos del género *Leishmania* del mundo, con nueve especies de estos patógenos registradas en 29 de los 32 departamentos del país (Ramírez et al., 2016). Por otro lado, de las 500 especies del género *Lutzomyia* (França, 1924) descritas en el mundo, en el país se han registrado 153, y de esta cifra, 18 son considerados vectores de leishmaniasis (Bejarano & Estrada, 2016; Romero et al., 2013). Asimismo, entre las 16 especies de seis órdenes de mamíferos infectados naturalmente con parásitos del género *Leishmania* (Salgado-Almario et al., 2019), al menos *Canis familiaris*, *Didelphis marsupialis* y *Proechimys canicollisi* han sido incriminadas como reservorios en el territorio nacional (Adler et al., 2003; Rivero Rodríguez et al., 2018; Roque & Jansen, 2014; B. L. Travi et al., 1998).

En Colombia existen dos grandes focos de leishmaniasis visceral: uno en la región Caribe y otro en el valle alto y medio del río Magdalena (Guhl F Restrepo M Angulo V Antunes C Campbell-Lendrum D et. Al, 2005). En el caso de la región Caribe colombiana, Sucre es uno de los departamentos donde la leishmaniasis presenta un carácter endémico, consecuencia de la circulación de por lo menos 4 especies de parásitos del género *Leishmania* (L. P. Martínez et al., 2010) y 21 especies de flebotomíneos del género *Lutzomyia*, muchos de los cuales exhiben tendencias antropofílicas (Bejarano & Estrada, 2016; L. P. Martínez et al., 2010; Salgado-Almario et al., 2019). En el periodo 2008 a 2019, el departamento sucreño ocupó el segundo lugar con más casos de leishmaniasis visceral (la forma grave de la enfermedad), después de Bolívar (Agudelo Chivatá, 2020). Sin embargo, en esta área los estudios de animales que actúan como hospederos del parásito se han enfocado principalmente en animales domésticos y silvestres que tienen antecedentes epidemiológicos como potenciales reservorios de *Leishmania* spp. como caninos, zarigüeyas y algunos roedores (Paternina Tuirán et al., 2015; Rivero Rodríguez et al., 2018; B. L. Travi et al., 1994). En consecuencia, se desconoce el papel que pueden desempeñar otros

mamíferos como bovinos, equinos y perezosos que aunque pueden resultar infectados y convertirse en hospederos secundarios o accidentales en el mantenimiento y dispersión de los parásitos causantes de leishmaniasis (Millán et al., 2014; Organización Panamericana de la Salud, 2019b; Quinnell et al., 2009), su papel podría estar desestimado por la falta de estudios.

La leishmaniasis, tiene un carácter focal y los determinantes ecológicos, reservorios y vectores varían en cada zona, por lo tanto, el conocimiento que se tenga de estas variables es de gran utilidad para caracterizar poblaciones vulnerables, identificar de manera oportuna posibles alertas y generar el conocimiento necesario para diseñar las estrategias de promoción, prevención y control de la enfermedad; en este contexto, el presente trabajo fue esfuerzo por conocer la identidad de los parásitos, vectores y reservorios asociados a un nuevo brote de leishmaniasis visceral registrado en el corregimiento Sabanas de La Negra, municipio de Sampedra, Sucre.

## MARCO TEÓRICO

### 2.1. Leishmaniasis en el mundo y en Colombia

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades zoonóticas causadas por parásitos protozoos del género *Leishmania*, los cuales son transmitidos por la picadura de insectos hematófagos del género *Lutzomyia*, en las Américas. De acuerdo a la especie parasitaria, la respuesta inmune del hospedero y la evolución de la enfermedad se presentan diferentes manifestaciones clínicas como lesiones en la piel (Leishmaniasis cutánea, LC), destrucción parcial o total de tejidos nasofaríngeos (leishmaniasis mucosa, LM) o afectación de órganos internos por la hiperplasia reticuloendotelial que se produce tras la infección del agente etiológico, que pueden llevar a la muerte en más del 95% de los casos en que la enfermedad no es tratada (Leishmaniasis visceral, LV) (Jiménez, 2015; OMS, 2017; Organización Mundial de la Salud, 2010; Organización Panamericana de la Salud, 2019a). La infección en el hombre se puede dar a partir de parásitos provenientes de un reservorio animal (ciclo zoonótico) o a partir de parásitos que el vector ha tomado de otro hospedero humano (ciclo antroponótico) este último ciclo de transmisión no se ha descrito en las Américas (Becerril Flores, 2011; Instituto Nacional de Salud, 2017; OMS, 2017).

La leishmaniasis es endémica en 102 países del mundo se estima que más de 350 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la enfermedad (Organización Panamericana de la Salud, 2019a), especialmente en las poblaciones más pobres del planeta, asimismo, esta parasitosis está asociada a la malnutrición, los desplazamientos de las comunidades y las malas condiciones de vivienda (Becerril Flores, 2011; Karimi et al., 2016; OMS, 2017).

En el mundo se registran 1,3 millones de nuevos casos de leishmaniasis y genera entre 20.000 y 30.000 muertes cada año, afectando física, psíquica, social y económicamente a las comunidades que la padecen (Organización Panamericana de la Salud, 2019a; Ponte-sucré, 2007). De acuerdo

con el análisis global de la carga de enfermedades infecciosas, las leishmaniasis en sus diferentes formas clínicas, son responsables por 2,35 millones de años de vida perdidos ajustados por discapacidad (AVAD o DALY por sus siglas en inglés) de los cuales 2,3 % provienen de los casos registrados en las Américas (Organización Panamericana de la Salud, 2019b).

En las Américas, la leishmaniasis está presente en 18 países, en éstos, la forma clínica más común es la leishmaniasis cutánea (LC), seguido de la leishmaniasis mucocutánea, que es registrada en 17 países, mientras la leishmaniasis visceral es endémica en 12; para esta última forma clínica, el 96 % de los casos fueron notificados por Brasil. En el 2017, 49.959 casos de leishmaniasis fueron contabilizados por los organismos internacionales de salud, de acuerdo a estas cifras, Colombia es el segundo país con más registros, después de Brasil (Organización Panamericana de la Salud, 2019a). En las Américas, en el 2017, se contabilizaron 4.239 nuevos casos de LV, representando un aumento regional de 26,4% en los casos, en comparación al 2016 y una letalidad del 7.6% (Organización Panamericana de la Salud, 2019a).

En Colombia, la leishmaniasis es una patología endémica en casi todo el territorio, excepto en San Andrés Islas, en el departamento del Atlántico y Bogotá. Se estima que en el país existen alrededor de 11 millones de personas en riesgo. La transmisión ocurre principalmente en el área rural, en donde se presentan las tres formas clínicas de la enfermedad, y dentro de éstas, la LC es la forma más frecuente y la de mayor distribución geográfica, (entre 95% y 98% de los casos); la LM, que es el resultado de la diseminación del parásito a los tejidos mucosos se puede presentar de semanas a años después de la lesión cutánea (1% a 4%) y la LV (entre el 0,1 y 1,5 %) (Ministerio de Salud y Protección Social, 2018).

En el caso específico de la leishmaniasis visceral en Colombia, el número de casos notificados en 2017 fue de 29, con una letalidad del 10,3% (3/29), cifra que es la más alta de acuerdo con el

registro histórico de la enfermedad (Instituto Nacional de Salud, 2017). Por otro lado el 44,83% (13/29) de los casos, correspondieron al área rural y el 55,17% (16/29) al área urbana y centros poblados; además, el 89,6 % (26/29) de los casos se presentaron en menores de 14 años, y el 10,3 % restante fueron tres (3) casos en adultos, uno de ellos inmunocomprometido (Instituto Nacional de Salud, 2017). En Colombia, la LV en el período epidemiológico XIII, de 2019, se confirmaron 15 casos, con una incidencia de 0,1 casos por 100.000 habitantes y cero muertes; por otro lado, el 53,3% de los casos se presentaron en el área rural; mientras que el 60% de los casos de LV se presentaron en los departamentos Bolívar (4), Sucre (3) y Córdoba (2) (Agudelo Chivatá, 2019).

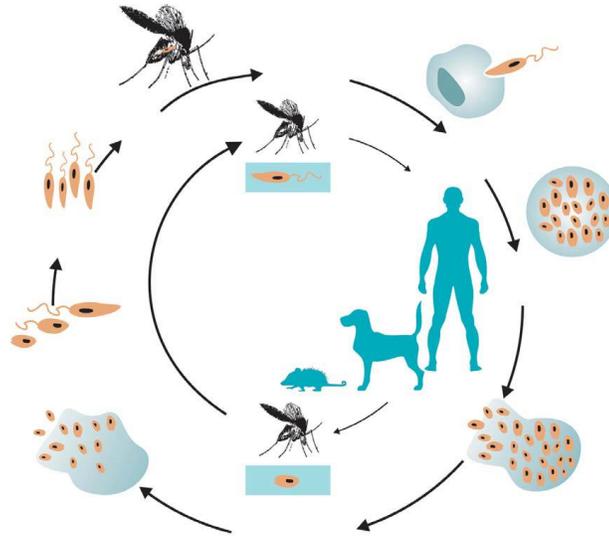
## **2.2. Agente etiológico de la leishmaniasis.**

Los parásitos del género *Leishmania* (Orden: Kinetoplastidae, Familia: Trypanosomatidae) son protozoos flagelados que infectan células del sistema inmune (macrófagos), células de algunos órganos (bazo, hígado) de humanos y otros vertebrados. En el género *Leishmania* se han agrupado 54 especies, de estas existen al menos 21 especies patógenas para el hombre (Akhoundi et al., 2017). Estos parásitos se agrupan clásicamente en dos subgéneros: *Leishmania* (*Leishmania*) y *L. (Viannia)*, esta clasificación deriva del sitio anatómico del intestino del vector donde lleva a cabo su desarrollo (Fraga et al., 2010; Ramírez et al., 2016), sin embargo, la taxonomía varía al considerar datos filogenéticos (tópico descrito más adelante). En las Américas han sido identificadas 15 especies del género *Leishmania* con diferente tropismo: visceral, cutáneo y mucoso (Organización Panamericana de la Salud, 2019b).

Los parásitos del género *Leishmania* presenta un ciclo de vida digenético, una fase como parásito intracelular obligado, que ocurre en los vertebrado y una fase de vida libre que ocurre en el tracto

digestivo de los vectores; en el primer ciclo mencionado, el parásito se encuentra en su forma intracelular conocida como amastigote, este mide entre 2 y 5  $\mu\text{m}$ , además, tiene forma redondeada, sin flagelo y se multiplica en células del sistema mononuclear fagocítico, principalmente en macrófagos; en el vector, se lleva a cabo la metaciclogenesis que involucra una serie de cambios morfofisiológicos (procíclico, nectomónado, haptomonado, paramastigote y metacíclico) que llevan a la producción de las formas infectivas del parásitos. En sus estados, los promastigotes varían en tamaño y forma, son extracelulares, alargados y poseen un flagelo que les permite la movilidad en el intestino de los insectos vectores, además, ambas formas del parásito se dividen por fisión binaria y poseen una única mitocondria modificada conocida como kinetoplasto (Karimi et al., 2016; Muskus & Villa, 2002; Organización Panamericana de la Salud, 2019b; Ríos Yuil & Sousa, 2010).

El ciclo de vida de *Leishmania* spp., inicia cuando un insecto vector (género *Lutzomyia* en el nuevo mundo) se infecta al ingerir sangre (Fig. 1 ) de un mamífero con macrófagos infectados con amastigotes, estos parásitos dentro del vector salen de las células hospederas y se transforman en promastigotes procíclico, que es la forma extracelular del parásito, luego, este se divide activamente adhiriéndose a la pared intestinal del insecto, finalmente, se transforma en promastigote metacíclico que a diferencia de la anterior fase, no se divide ni se adhiere a la pared del intestino sino que se dirige a las glándulas salivales del flebotomíneos, convirtiéndose así en un insecto infectante para una persona u otro mamífero, que al ser picado por flebotomíneos al alimentarse de su sangre, inocular los promastigotes metacíclicos en la piel, los parásitos luego son fagocitados por macrófagos, lugar donde se transformaran en amastigotes, repitiéndose así el ciclo del parásito (Nieves & Rondon, 2007; Organización Panamericana de la Salud, 2019b; Ríos Yuil & Sousa, 2010).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. en el vertebrado y en el flebotómico (Organización Panamericana de la Salud, 2019b).**

Recientemente a Colombia se le ha catalogado como el país con más parásitos del género *Leishmania* del mundo, con 9 especies descritas: *Le. panamensis*, *Le. braziliensis*, *Le. guyanensis*, *Le. infantum*, *Le. amazonensis*, *Le. mexicana*, *Le. colombiense*, *Le. lainsoni* y *Le. equatorensis* (Ramírez et al., 2016), las cuales han sido registrados en 29 departamentos, cuatro de estas especies están en el departamento de Sucre: *Le. panamensis*, *Le. braziliensis*, *Le. guyanensis* y *Le. infantum* (L. P. Martínez et al., 2010; Paternina-gómez et al., 2013; Rivero Rodríguez et al., 2018; Salgado-Almario et al., 2019).

### **2.3. Taxonomía de parásitos del género *Leishmania***

El conocimiento actual de los datos filogenéticos, permite organizar la estructura taxonómica del género *Leishmania* en los niveles de secciones, subgéneros, complejos de especies y especies. La parte mejor caracterizada del género *Leishmania* es la sección *Euleishmania* compuesta de al menos cuatro subgéneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* y *Mundinia*.

El subgénero *Leishmania* tiene cuatro complejos de especies: *Le. donovani*, *Le. major*, *Le. mexicana* y *Le. tropica* (Akhoundi et al., 2017). El subgénero *Viannia* está restringido a los neotrópicos, mientras que el subgénero *Leishmania* ocurre tanto en el nuevo mundo como en el viejo mundo; por otro lado, si la escala de diversidad genética entre y dentro de los complejos puede correlacionarse con la establecida para el subgénero *Leishmania*, es posible clasificar el subgénero *Viannia* en los complejos de especies *Le. braziliensis*, *Le. guyanensis*, así como las especies *Le. lainsoni* y *Le. naiffi* (Akhoundi et al., 2017) (Figura 2).

Recientemente se ha creado, un nuevo subgénero, *Leishmania (Mundinia)*, compuesta por especies de *Leishmania* responsables de enfermedades humanas y animales anteriormente reunidas en el complejo *Le. enriettii* y que ahora lo conforman las especies *Le. enriettii*, *Le. martiniquensis*, *Le. 'siamensis'*, 'cepa de Ghana' y *Le. macropodum* (Akhoundi et al., 2017; Sereno, 2019). Este último junto con *Le. 'siamensis'* se consideran *nomem nudum*, dada la falta de adhesión al código internacional para la nomenclatura zoológica (Sereno, 2019).

La división *Paraleishmania* es inestable, debido a la falta de análisis genético en profundidad, en este se agrupan, *Porcisia* integrado por los parásitos de puercoespines neotropicales originalmente descritos como *Le. hertigi* y *Le. deanei*, del mismo modo las especies *Le. herreri*, *Le. equatorensis* y *Le. colombiensis*, así como el antiguo género *Endotrypanum* (Akhoundi et al., 2017).

El estudio a nivel molecular dentro del género *Leishmania*, fue esencial para revelar varios casos de sinonimia como, por ejemplo, *Le. infantum* (sinónimo *Le. chagasi*) (Leblois et al., 2011) y *Le. mexicana* (sinónimo *Le. pifanoi*) (Schonian et al., 2009) (Akhoundi et al., 2016, 2017)

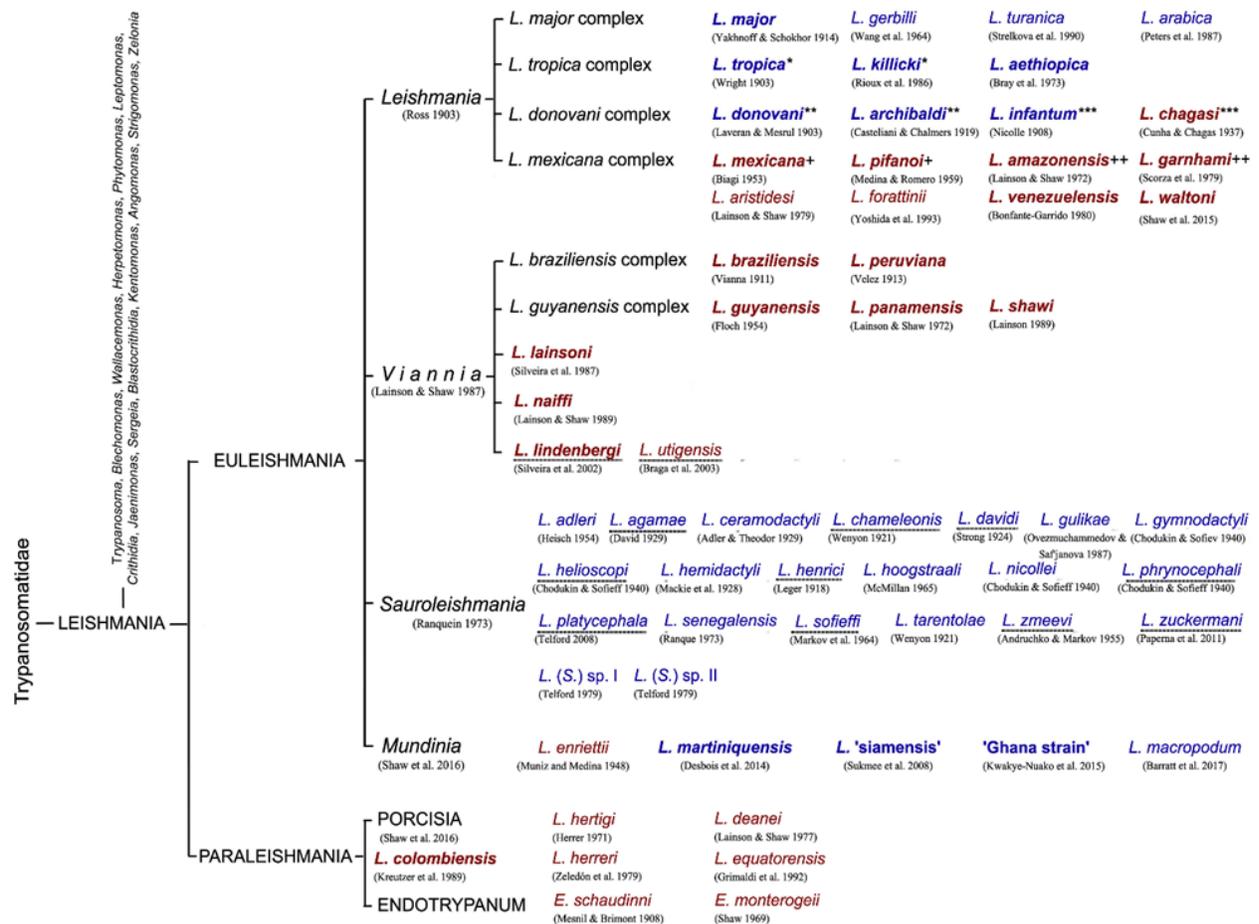


Figura 2. Clasificación taxonómica del género *Leishmania*

Nota. Los signos \*, +: representan sinónimos; diferentes números de signos de asterisco (\*) y más (+) significan que el nombre de especie es sinónimo de la especie original. Subrayado: Sin clasificación final. *Le. 'siamensis'* y *Le. martiniquensis* también se han encontrado en el Nuevo Mundo. Los nombres de *Leishmania* entre comillas son nombres no oficiales sin descripciones formales. La especie patógena humana, están escritos en negrita. Las especies del viejo mundo y del nuevo mundo se destacan en azul y rojo respectivamente (Akhoundi et al., 2017)

La detección de *Leishmania* spp, seguida de la discriminación de la especie en un hospedero incluyendo el humano, juega un papel importante en los procesos de vigilancia y control de la infección. Para llevar a cabo estos propósitos, se recurre a métodos que pueden diferir en la sensibilidad, la especificidad, el costo, la necesidad de personal especializado, el tiempo en la

obtención de resultados, entre otros aspectos que tiene gran relevancia en la decisión de la elección de la herramienta. Entre los métodos más comunes en la detección del parásito y que son usados en el diagnóstico de algunas de las formas de la enfermedad, podemos mencionar, el examen directo o microscópico, el cultivo, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Pilar Zambrano, 2014); En el anexo 02, podemos ver de forma resumida, una variedad de técnicas que pueden ser usadas para identificar el agente etiológico de la leishmaniasis, las cuales se organizan de acuerdo a la muestra a analizar, el nivel de discriminación del parásito al que se puede llegar, la sensibilidad, la especificidad, entre otros factores; variables que están sujetas a la disponibilidad de recursos del que se disponga y los objetivos trazados (Akhoundi et al., 2017).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es una herramienta que presenta buena especificidad y sensibilidad en la detección de ácido desoxirribonucleico (ADN) parasitario, esta técnica en conjunto con otras, permite identificar las especies que integran el género *Leishmania*, lo que representa gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad (Chena et al., 2013). Entre los blancos genéticos que son amplificados, se encuentran algunos que presentan mejor sensibilidad que otros, debido al número de copias que se encuentran en el parásito, como por ejemplo, las secuencias de ADN de los minicírculos del kinetoplasto (ADNk), el gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSU ARNr), las secuencias repetitivas del DNA genómico entre otros; los cuales, han sido utilizados no solo para la detección sino para la identificación de los parásitos del género *Leishmania*; por otro lado, la especificidad y eficiencia puede ser ajustada según la necesidad, a regiones específicas en el material genético ya sean conservadas o variables (Akhoundi et al., 2017; Chena et al., 2013). Las características de diferentes genes utilizados para la detección,

identificación y cuantificación de especies de *Leishmania*, se resumen en el anexo 03 (Akhoundi et al., 2017).

Los métodos indirectos como los serológicos, tienen uso limitado en la leishmaniasis cutánea, a causa de la variabilidad en la sensibilidad y especificidad, pero puede ser de gran utilidad como apoyo diagnóstico de la leishmaniasis visceral (Organización Mundial de la Salud, 2010). Entre los métodos serológicos más usados está la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), en ambos métodos se detectan principalmente anticuerpos del tipo IgG contra *Leishmania* spp., y su especificidad depende del antígeno usado; otros métodos muy utilizados son la intradermorreacción de Montenegro (IDRM) en el cual se evalúa la respuesta celular y la inmunocromatografía (tiras de diagnóstico rápido) con antígeno RK39; esta última prueba es empleada para detectar anticuerpos específicos en contra de los parásitos del género *Leishmania* pertenecientes al complejo de especies *Le. donovani*, cuyo único representante en América es *Le. Infantum* (Organización Mundial de la Salud, 2010; Organización Panamericana de la Salud, 2018; Pilar Zambrano, 2014). Por otro lado, en el caso puntual de la IFI, la lectura e interpretación de la prueba se realiza mediante la observación en microscopio de fluorescencia en el que se determina el título en la última dilución del suero en la cual se ve fluorescencia en toda la periferia del promastigote, a partir de esta lectura se cataloga como positiva las muestras con títulos mayores o iguales a 1/32; no obstante, en la IFI se debe tenerse cuidado con las reacciones cruzadas (falsos positivos) con anticuerpos contra otros trypanosomatídeos como los del género *Trypanosoma*, lo que reduce la especificidad de la prueba y llevar a diagnósticos errados, sin embargo, la combinación de la IFI con métodos como la PCR permiten el incremento de la especificidad. La sensibilidad de la IFI es variable dependiendo de la forma

clínica de la enfermedad, para el caso de la LV es de alrededor del 90% (Organización Mundial de la Salud, 2010; Organización Panamericana de la Salud, 2018).

#### 2.4. Vectores de leishmaniasis

Los vectores naturales de los parásitos del género *Leishmania* son dípteros holometábolos, pertenecientes a la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae, predominan en las regiones tropicales y subtropicales. El grupo está compuesto por seis géneros, pero en las Américas, *Lutzomyia* (França, 1924) es el más importante (Organización Panamericana de la Salud, 2019b; Young & Duncan, 1994). Morfológicamente, se caracterizan por presentar un tamaño promedio de 3 a 5mm de longitud; en estado de reposo los flebotomíneos pliegan sus grandes alas formando un ángulo agudo (en forma de letra V) (Salomón, 2009), por eso se les conoce como aludos; poseen un cuerpo en el que se diferencia claramente la cabeza, el tórax y el abdomen (Fig. 3), éste está cubierto de cerdas y tienen patas largas, sus piezas bucales están adaptadas para la hematofagia y por lo general sólo las hembras son capaces de ingerir sangre como fuente de proteínas para completar la maduración de sus huevos, los machos por su parte se alimentan de soluciones azucaradas que adquieren de las plantas (Carrascal Mercado, 2019; Feliciangeli, 2006; Organización Panamericana de la Salud, 2019b).



Figura 3. Caracteres anatómicos externos de *Lutzomyia* spp. (Daniel Guzmán).

Estos insectos tienen actividad crepuscular y nocturna, y su ciclo biológico se desarrolla en la tierra, razón por la cual son conocidas como moscas de la arena; su desarrollo pasa por cuatro estados: huevo, larva, pupa y adulto, y su ciclo de vida varía en duración según la especie, en promedio puede tardar 45 días. Además de ser reconocidos como insectos vectores de leishmaniasis, también transmiten los agentes etiológicos causantes de estomatitis vesicular, bartonelosis o enfermedad de Carrion, ambas enfermedades de importancia en la Salud Pública (Felicangeli, 2006; Gutiérrez et al., 2014; Organización Panamericana de la Salud, 2019b; Sánchez-Saldaña et al., 2004).

De más de 800 especies reconocidas de flebotomíneos, aproximadamente 500 se encuentran en el Nuevo Mundo y 375 en el Viejo Mundo. Su rango de vuelo es de aproximadamente 1,5 km por día (Akhoundi et al., 2016; Bejarano & Estrada, 2016), se ha estimado que de las especies del género *Lutzomyia* que han sido encontrada en América, aproximadamente 50 están implicadas como transmisores (Nieves & Rondon, 2007). En Colombia se han registrado 153 especies de flebotomíneos del género *Lutzomyia* (Bejarano & Estrada, 2016; Romero et al., 2013).

### **2.5. Reservorios de *Leishmania* spp.**

Los reservorios de las especies del género *Leishmania*, son animales vertebrados que mantienen el parásito en la naturaleza, permiten que los insectos vectores se infecten y pueda persistir el ciclo de transmisión (Organización Panamericana de la Salud, 2019b). Por lo general se presenta un reservorio principal para cada especie del género *Leishmania* en un foco determinado, y a su vez, otros mamíferos de la misma zona también pueden estar infectados y convertirse en hospederos

secundarios o accidentales (Organización Mundial de la Salud, 2010; Organización Panamericana de la Salud, 2019b). Por otro lado, las interacciones entre hospederos y parásitos, son multifactoriales, complejas, circunstanciales y dinámicas, y varían de acuerdo a los cambios del ambiente. Bajo tales circunstancias un reservorio puede considerarse como un sistema que incluye una o varias especies de mamíferos, que son los que mantienen el parásito en la naturaleza, y dentro de este sistema cada integrante (especie) puede desempeñar un papel distinto en la transmisión de los parásitos en un período y lugar determinado (Organización Panamericana de la Salud, 2019b; Roque & Jansen, 2014). Finalmente, los mamíferos domésticos o silvestres infectados por *Leishmania* spp., pueden o no, mostrar signos de infección (Organización Mundial de la Salud, 2010; Organización Panamericana de la Salud, 2019b).

En las Américas, los reservorios reconocidos de *Leishmania* spp., incluyen a los marsupiales (*Didelphis* spp.), el zorro (*Cerdocyon thous*), los roedores (*Rattus* spp, *Proechimys* spp., *Nectomys* spp., *Oryzomys* spp., entre otros), los osos perezosos (*Choloepus* spp. y *Bradypus* spp.) y al oso hormiguero menor (*Tamandua tetradactyla*), sin dejar de mencionar a *Canis familiaris*, incriminado como el reservorio domestico de *Le. infantum* más importante en América (Organización Panamericana de la Salud, 2019b; Said et al., 2001; Tovar A & Yasnot A, 2017).

En Colombia, los vertebrados que se han encontrado infectados de forma natural con parásitos del género *Leishmania* pertenecen a 16 especies de seis órdenes de mamíferos (Salgado-Almario et al., 2019), entre estos se reconoce como potenciales reservorios de *Leishmania* spp. a *C. familiaris*, *D. marsupialis*, *Choloepus hoffmanni*, *P. canicollis*, *Rattus rattus* y *Melanomys caliginosus* (Organización Panamericana de la Salud, 2019b; Rivero Rodríguez et al., 2018), de estos animales

solo hay normatividad para *C. familiaris* que al ser encontrado positivo por pruebas serológica o aspirado de médula ósea o de ganglio poplíteo, puede ser sometido a eutanasia canina concertada como medida para controlar la propagación del patógeno (Víctor Acero et al., 2015; P. Zambrano & Mercado, 2014), no obstante los resultados de trabajos realizados en Brasil muestran que esta medida tienen poco efecto sobre la disminución del número de casos de la enfermedad, por lo cual es considerado poco satisfactorios y motivo de controversia en ese país (Werneck, 2016; P. Zambrano & Mercado, 2014)

## **2.6. Fuentes de ingesta de flebotomíneos**

La exploración de las fuentes de ingesta de sangre de los flebotomíneos tiene gran importancia epidemiológica, porque permite identificar la disponibilidad o las preferencias en la alimentación de los vectores, asimismo, identificar potenciales reservorios del parásito, además, tales estudios contribuyen a la aclaración del ciclo de transmisión natural en un área determinada, contribuyendo así en el desarrollo de estrategias para el control de las leishmaniasis, basándose en la interrupción del vínculo epidemiológico entre vector y reservorio (Baum et al., 2015; Haouas et al., 2007)

## ANTECEDENTES

En el departamento de Sucre, la incidencia general de la leishmaniasis en el 2017 fue de 13,4 x 100.000 habitantes, con 41 casos confirmados, de estos el 75,6 % (31/41) fueron registrados por 4 municipios: Ovejas, Chalan, Sampués y Coloso. En 2017, el municipio de Sampués tuvo una incidencia de la enfermedad de 26,7 x 100.000 habitantes, con una población en riesgo de adquirir leishmaniasis de 18.707 habitantes (Instituto Nacional de Salud, 2020).

Investigaciones realizadas en el departamento de Sucre, han descrito cuatro (04) especies de parásitos del género *Leishmania*, tres de estas se agrupan en el subgénero *Leishmania (Viannia)*: *Le. panamensis*, *Le. braziliensis* y *Le. guyanensis*, implicadas en la forma cutánea de la enfermedad (L. P. Martínez et al., 2010), y una (01) especie del subgénero *Leishmania (Leishmania)*: *Le. infantum*, patógeno implicado en la etiología de LV (Herrera et al., 2018; Rivero Rodríguez et al., 2018). En el municipio de Sampués, se ha encontrado que *Le. panamensis* causa LC (L. P. Martínez et al., 2010), por otro lado, aunque se han registrado casos autóctonos de LV en el municipio de Sampues, el agente causal no sido caracterizado.

En la costa Caribe de Colombia, Sucre es el departamento donde se ha registrado la mayor diversidad de especies del género *Lutzomyia*, con 21 especies identificadas (Bejarano & Estrada, 2016), algunos de estos flebotomíneos están asociadas al ciclo epidemiológico de la leishmaniasis visceral y cutánea, se destaca *Lu. evansi*, por estar incriminada en la transmisión de *Le. infantum* (Cortés Alemán et al., 2009; Lambraño Cruz et al., 2012; BL Travi et al., 1990), el agente etiológico de la leishmaniasis visceral en la región, además, *Lu. evansi*, se ha encontrado infectado naturalmente con *Le. braziliensis* (Bejarano et al., 2012; Luis E. Paternina et al., 2012); del mismo modo, otros flebotomíneos como *Lu. panamensis* y *Lu. gomezi* están asociados con la transmisión de parásitos causantes de LC en la zona, mientras que otras especies como *Lu.*

*cayennensis cayennensis* y *Lu. dubitans* han exhibido tendencias antropofílicas sin que quede claro su papel en la transmisión (Cortés Alemán et al., 2009; Lambraño Cruz et al., 2012; Luís E. Paternina et al., 2016; Romero et al., 2013). En Sampedo se han descrito a las especies *Lu. evansi* y *Lu. serrana* (S. Cochero & Blanco, 2001).

Dentro de los mamíferos que han sido incriminados como reservorios en el departamento, o que podrían estar desempeñando un papel en la epidemiología de la leishmaniasis, se encuentra: *Canis familiaris*, en el cual se registró una prevalencia total de infección por *Leishmania* spp. de 33,6 % en los municipios de Sincelejo, Sampedo y Ovejas (Paternina-gómez et al., 2013; Paternina Tuirán et al., 2016); asimismo, en un canino residente en zona urba del municipio de Ovejas se aisló *Le. infantum* (Rivero Rodríguez et al., 2018). Un estudio realizado en roedores de la especie *Mus musculus* en el en área urbana del municipio de Ovejas, encontró una alta seroprevalencia contra *Leishmania* spp. (Canchila Muñoz & Contreras Gomez, 2016), por otro lado, en Colosó se registró infección natural con *Le. infantum* en *D. marsupialis* y *Proechimys canicollis* (Adler et al., 2003; B. L. Travi et al., 1998).

Estudios en flebotómicos del departamento de Sucre, realizados en los municipios de Ovejas, Los Palmitos, Sincelejo y Colosó, han logrado identificar el material genético de varias especies de vertebrados, los cuales son usados como fuentes de ingesta por flebotómicos del género *Lutzomyia*, entre estas especies identificadas se registraron a *Equus caballus* (en la ingesta sanguínea de *Lu. evansi*, *Lu. panamensis* y *Lu. cayennensis cayennensis*), *Equus asinus* (*Lu. evansi* y *Lu. panamensis*), *Bos taurus* (*Lu. evansi*, *Lu. panamensis* y *Lu. c. cayennensis*), *Tamandua mexicana* (*Lu. shannoni* y *Lu. trinidadensis*), *Proechimys guyanensis* (*Lu. evansi*, *Lu. panamensis* y *Lu. c. cayennensis*), *Mabuya* sp. (*Lu. micropyga*), *Anolis* sp. (*Lu. micropyga*), *Sus scrofa* (*Lu. evansi* y *Lu. gomezi*) y *Gallus gallus* (*Lu. evansi*), además, se evidenció la tendencia antropofílica

de *Lu evansi*, *Lu. panamensis*, *Lu. micropyga*, *Lu. shannoni* y *Lu. atroclavata*; entre los vertebrados mencionados, las fuentes de ingesta más importantes para *Lu. evansi* fueron los bovinos, equinos, los humanos y los cerdos (Luís E. Paternina et al., 2016; Paternina Tuiran, 2012). En un estudio reciente realizado en el municipio de San Cayetano, en Bolívar, encontró a *Lu. evansi* con ingesta sanguínea de humano, carnero, cerdo, vaca y perro, con lo cual se confirman hábitos antropofílicos, zoofílicos y el carácter ecléctico de este vector (L. Martínez, 2018).

Dado que los determinantes ecológicos de la leishmaniasis varían de un lugar a otro y que los aspectos anteriormente mencionados son en su mayoría desconocidos en la zona bajo estudio, en este trabajo se intentó describir los determinantes eco-epidemiológicos involucrados en la aparición de un nuevo caso de leishmaniasis visceral humana en Sabanas de La Negra, corregimiento del municipio Sampués en el departamento Sucre.

## OBJETIVOS

### 4.1. General

Caracterizar eco-epidemiológicamente un brote de leishmaniasis visceral humana en Sabanas de La Negra, un corregimiento del municipio Sampués, Sucre.

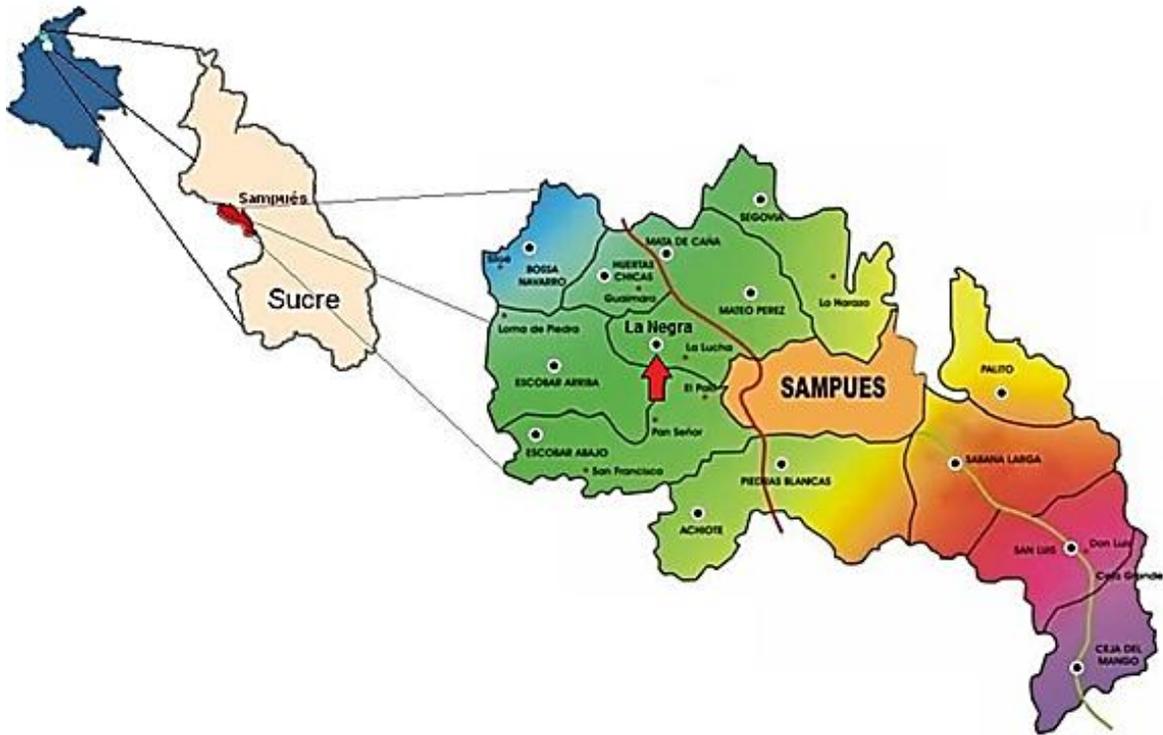
### 4.2. Específicos

1. Determinar la diversidad y actividad nocturna de flebotómíneos del género *Lutzomyia* en la zona bajo estudio.
2. Determinar la frecuencia de uso de vertebrados como fuentes de ingesta sanguínea para los flebotómíneos.
3. Determinar la prevalencia de anticuerpos frente a *Leishmania* spp. en animales domésticos, sinantrópicos y silvestres.
4. Identificar genéticamente las especies de parásitos del género *Leishmania* que infectan de forma natural a mamíferos y flebotómíneos.
5. Estimar la frecuencia de infección con *Leishmania* spp en vertebrados y flebotómíneos.

## METODOLOGÍA

### 5.1. Área de estudio.

El estudio se realizó en el corregimiento Sabanas de la Negra, zona rural del municipio de Sampués en el departamento de Sucre (Fig. 4), área que en términos ecológicos se encuentran dentro de la zona de vida “Bosque Seco Tropical” (Bs-T) (Holdridge, 1967). En este lugar, se registró un caso autóctono de leishmaniasis visceral humana, en agosto de 2016 (Instituto Nacional de Salud, 2016), en un menor de 11 meses de edad de sexo masculino, perteneciente al grupo étnico indígena; este menor presentó cuadro clínico compatible con LV como: fiebre, hepatomegalia, esplenomegalia, trombocitopenia y anemia por lo cual fue hospitalizado y mediante pruebas de laboratorio diagnosticado con LV; seguido al diagnóstico le fue suministro N-metil glucamina durante 28 días (datos no publicados, Secretaria de Salud Departamental de Sucre). Por otro lado, en términos demográficos, el corregimiento Sabanas de La Negra, en el 2017, contaba con una población de 1.369 habitantes, de los cuales el 30% eran menores de 14 años (Alcaldía Municipal de Sampués en Sucre, 2018).



**Figura 4. Municipio de Sampués y sus corregimientos**

(<http://sampuessucre.micolombiadigital.gov.co/municipio/municipio-de-sampues-en-colombia>)

## **5.2. Tipo de estudio**

Se realizó estudio de foco de tipo descriptivo. En el área de muestreo se realizaron visitas a las casas cercanas al domicilio donde se registró el caso autóctono de LV humana a partir de febrero de 2017. Al jefe de hogar se le explicaron los objetivos del trabajo, se respondieron dudas y se solicitó el permiso para la captura de flebotomíneos y pequeños mamíferos, tanto en el domicilio como en sus alrededores, posteriormente se le solicitó el consentimiento informado (Anexo 01) para la toma de muestras en animales domésticos.

### **5.3. Determinación de la diversidad y actividad nocturna de los flebotomíneos.**

#### **5.3.1. Captura de flebotomíneos.**

La captura de los flebotomíneos se realizó durante tres noches consecutivas, en el muestreo se utilizaron tres (03) trampas de luz emitida por diodos (LED) tipo Unisucre (Castillo Arroyo, 2011) (Fig. 4), las cuales fueron operadas entre las 18:00 y las 06:00 horas, éstas estuvieron ubicadas en el intra, peri y extradomicilio (n=1 trampa por ambiente domiciliar) en la vivienda del caso índice de LV, además, con el fin de estudiar el comportamiento de la actividad nocturna de estos insectos, en cada trampa se cambió la malla de recolección cada hora, y se tomaron datos de humedad relativa y temperatura; los datos anteriores fueron sometidos a la prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk, mediante el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2016), utilizando el mismo programa estadístico y con base en la información anterior se aplicó una prueba paramétrica, el coeficiente de correlación de Pearson, con el cual se determinó si las variables ambientales estaban relacionadas linealmente o no con el número de individuos capturados (D. Martínez et al., 2018). Por otro lado, los índices de Dominancia (D), diversidad de Simpson (1-D) y riqueza específica (S) de flebotomíneos en la zona de estudio, fueron calculados mediante en el programa Excel 2016.



**Figura 4. Trampa de luz LED tipo Unisucre ubicada en el peridomicilio. (Daniel Guzmán)**

### **5.3.2. Determinación taxonómica de flebotómíneos.**

Todos los insectos recolectados en las trampas fueron examinados bajo estereoscopio, de esta forma se separaron los flebotómíneos de otros grupos de insectos. Seguidamente los insectos de interés fueron agrupados en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml, según el día, sitio y hora de captura. Las hembras con restos de ingesta de sangre contenida en el abdomen fueron separadas y almacenadas individualmente, para realizar posteriormente la caracterización molecular de las fuentes de su ingesta. Ambos grupos de insectos fueron disectados empleando microestiletos y cuchillas estériles, a cada uno se les cortaron los tres últimos segmentos abdominales, la cabeza y una ala, estos segmentos fueron sometidos a clarificación química en Lactofenol (Ácido Láctico y Fenol, 1:1) para remover las setas y permitir la visualización de las estructuras internas esclerotizadas, que son determinantes en la identificación taxonómica, mientras que el resto del cuerpo del insecto (tórax y segmentos proximales del abdomen) fueron refrigerados en microtubos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta ser

utilizados en la extracción de ADN total. La identificación taxonómica fue realizada usando las claves taxonómicas de Young & Duncan (1994) (Young & Duncan, 1994).

#### **5.4. Determinación de la frecuencia de uso de animales vertebrados como fuentes de ingesta sanguínea para los flebotomíneos.**

##### **5.4.1. Extracción de ADN a partir de muestras de flebotomíneos.**

A partir del tórax y los segmentos proximales del abdomen de cada hembra flebotomínea (alimentada y no alimentada), se realizó la extracción de ácidos nucleicos usando el protocolo de alta concentración de sales descrito por Collins et al. (1987), con las siguientes modificaciones: maceración mecánica del insecto con el equipo TissueLyser II (QIAGEN®) en 100 µl del búfer de lisis (0.08 M NaCl, 0.16 M sacarosa, 0.06 M EDTA, 0.5% SDS, 0.1 M Tris-HCL a pH de 7.5), luego se adicionaron 5.4 µl de Proteinasa K (2ug/uL) y se incubó a 65°C durante 2 horas, completado el tiempo se inactivó la proteinasa a 95°C por 2 minutos, posteriormente se adicionaron 100 uL de acetato de potasio 8M y se incubó en hielo durante 30 minutos, a continuación se realizó una centrifugación a 12.000 rpm a 4°C por 20 minutos. El sobrenadante obtenido del paso anterior fue depositado en un nuevo tubo, luego se le adicionaron 200 µl de isopropanol y fue mantenido a -20°C durante toda una noche, posteriormente se realizó una centrifugación a 12.000 rpm a 4°C por 20 minutos y se descartó el sobrenadante, el precipitado obtenido fue lavado con etanol al 70 % y posteriormente secado a temperatura ambiente, finalmente el ADN fue resuspendido en 50uL de agua ultrapura. Este ADN se conservó a -20°C hasta su utilización en la detección del ADN de mamíferos del ADN y de parásitos del genero *Leishmania*.

#### **5.4.2. PCR múltiple del gen Cyt B para la identificación de las fuentes de ingesta de los insectos flebotomíneos del género *Lutzomyia*.**

Se realizó una amplificación diferencial del gen Cyt B mediante PCR multiple, para esto se usó el cebador reverso universal UNREV 1025 y un cebador delantero específico para cada especie de mamífero (Tabla 1). Para *Bos taurus* el cebador usado fue Cow121F el cual delimita un fragmento de 561 pb, para *Sus scrofa* se usó el cebador Pig573F que flanquea un fragmento de 453 pb, mientras que *Ovis aries* el cebador Goat894F produce un amplicon de 132 pb, en *Canis familiaris* se usó el cebador Dog368F con el que se obtiene una banda de 680 pb, y en *Homo sapiens* el iniciador Human741F se obtiene un amplicon con una longitud de 334 pb (Kent & Norris, 2005). En los flebotomíneos en los que no fue posible amplificar los fragmentos de longitud diferencial, se amplificó un fragmento del gen Cyt B conservado en todos los vertebrados, a fin de descartar una posible inhibición. Esta PCR se realizó con los cebadores UNFOR403 ( TGAGGACAAATATCATTCTGAGG) y UNREV1025 (GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA) que delimitan un segmento de aproximadamente 623 pb y fue efectuada según las condiciones previamente descritos por Kent & Norris (2005) (Kent & Norris, 2005).

Para la PCR fue usada la polimerasa Gotaq® DNA Polymerase (5u/μl) (Promega) y junto con esta los componentes dispuestos por el fabricante como MgCl<sub>2</sub> (25 mM), dNTPs y el 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer. Como controles positivos se utilizó el material genético de cada una de las especies de mamíferos identificadas por los cebadores. Se utilizó el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación, compuestos de una etapa de desnaturalización a 95°C por 40

segundos, alineamiento de cebadores a 58° C por 40 segundos, extensión a 72°C por 48 segundos y finalmente una extensión final a 72° C durante 5 minutos.

**Tabla 1. Secuencia de los cebadores usados en la PCR múltiple para detección de fuentes de ingesta sanguínea.**

Hospedero	Cebador	Secuencias (5´-3´)	Fragmento (pb)
<i>Capra hircus</i>	Goat894F	CCTAATCTTAGTACTTGTACCCTTCCTC	115
<i>Homo sapiens</i>	Human741F	GGCTTACTTCTCTTCATTCTCTCCT	333
<i>Sus scrofa</i>	Pig573F	CCTCGCAGCCGTACATCTC	443
<i>Bos taurus</i>	Cow121F	CATCGGCACAAATTTAGTCG	558
<i>Canis familiaris</i>	Dog368F	GGAATTGTA CTATTATTCGCAACCAT	681
<b>Mamíferos</b>	UNREV 1025	GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA	-----

## **5.5. Determinación de la prevalencia de anticuerpos frente a *Leishmania* spp. en animales domésticos, sinantrópicos y silvestres.**

### **5.5.1. Captura de animales domésticos y recolección de muestras**

Posterior a la firma del consentimiento informado por parte de los propietarios, cada animal doméstico (caninos, equinos y bovinos) fue inmovilizado con ayuda de sus tenedores, seguidamente se les tomó una muestra de sangre periférica, que, en el caso de los caninos, se obtuvo por punción de la vena cefálica, mientras que, en equinos y bovinos, se realizó por punción de la vena yugular. Cada muestra fue dividida en dos (02), una para la

detección de anticuerpos contra parásitos del género *Leishmania* y la otra para la detección y caracterización genética del parásito, basada en técnicas de biología molecular.

### **5.5.2. Trampeo y manejo de roedores**

Para la captura de roedores se utilizaron 12 trampas de encierro tipo Sherman, las cuales fueron instaladas en el intra y peridomicilio de la vivienda del caso índice, durante 30 días. Las trampas fueron cebadas con avena molida, esencia de vainilla y mantequilla de maní, estas fueron colocados antes del anochecer y los roedores se recolectaron a la mañana siguiente. Las trampas con roedores se colocaban cuidadosamente en bolsas plásticas y fueron trasladadas al laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre para el procesamiento de los roedores y la respectiva toma de muestra. La captura de los animales sinantropicos y silvestres se realizó bajo el amparo del “Permiso Marco de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial”, otorgado por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) a la Universidad de Sucre, en su resolución 391, 11 de abril de 2016. Por otro lado se determinó el éxito de trampeo de roedores y zarigüeyas, definido como el cociente entre el número de individuos capturados y el esfuerzo de captura (número de trampas colocadas multiplicado por el número de días que funcionaron), el resultado obtenido se multiplicó por 100 (Organización Panamericana de la Salud, 2015).

### **5.5.3. Obtención de sangre de los roedores capturados**

Los roedores fueron anestesiados con vapores de éter, para esto, en la bolsa que contenía a cada roedor, se colocó una mota de algodón empapada con éter por dos minutos (Mills et al., 1995). Bajo los efectos de la anestesia se sacó el animal para la determinación del sexo y para tomar la muestra de sangre por punción cardíaca, esta muestra fue dividida en dos

alícuotas: una para la detección de anticuerpos contra parásitos del género *Leishmania* y la otra para la detección y caracterización molecular del parásito. Los roedores fueron sacrificados administrando una sobredosis de anestésico mediante la colocación de algodón embebido en éter en la zona nasal (Organización Panamericana de la Salud, 2015).

#### **5.5.4. Captura de animales silvestres y recolección de muestras.**

Para la captura de didélfidos, se instalaron 6 trampas de encierro tipo Tomahawk, ubicadas en el peridomicilio y extradomicilio por 33 días, adicionalmente los osos perezosos fueron capturados en la mañana cuando estos animales bajan de los árboles a realizar sus deposiciones, previo avistamiento de los pobladores de la zona. Los animales capturados fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina (30 mg/kg y 1 mg/kg respectivamente), se realizó el respectivo registro fotográfico y se analizó la condición general de los animales. Finalmente se realizó la toma de muestra sanguínea por punción cardiaca. Posteriormente, a cada animal capturado se le implantó un microchip con transpondedores RFID pasivos subcutáneamente, para determinar la tasa de recapturas, finalmente fueron liberados en áreas boscosas cercanas al lugar de captura.

#### **5.5.5. Detección de anticuerpos IgG contra *Leishmania* spp. por inmunofluorescencia indirecta (IFI).**

La prueba de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos contra parásitos del género *Leishmania*, se realizó en las muestras de caninos, bovinos, roedores y equinos (Camargo, 1966), para el resto de especies no fue posible (osos perezosos y zarigüeyas) por la carencia de los anti-IgG correspondientes. La IFI se realizó en placas antigenadas con promastigotes de *Le. infantum* (CF/CO/2017/356), asimismo, se realizó IFI diferencial con placas antigenadas con epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

(DM/CO/2017/312) para descartar reacción cruzada con parásitos del género *Trypanosoma*; ambos en fase estacionaria temprana de crecimiento. Para esto, los parásitos de cada entidad fueron lavados tres veces con PBS (búfer fosfato salino) pH 7.2 por centrifugación, posteriormente se ajustó su concentración a  $2 \times 10^6$  parásitos/ml en PBS, 20  $\mu$ L de esta suspensión fueron depositados en cada pozo de la placa para IFI para su fijación y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche hasta su uso. Diluciones seriadas (1:16 hasta 1:512) de suero de los animales bajo estudio fueron evaluados, en el proceso se usaron sueros de animales previamente evaluados y se seleccionaron sueros positivos y negativos como controles (20  $\mu$ L).

Todos los sueros fueron depositados sobre los pozos recubiertos por los antígenos, seguidamente las placas fueron incubadas por 45 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda, se lavaron tres veces por 5 minutos con PBS 1X mas Tween 20, se agregaron 20  $\mu$ L del conjugado (anti-IgG marcada con fluoresceína diluida en Azul de Evans (1:300) de cada especie evaluada, se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos en cámara húmeda y bajo oscuridad. Posteriormente se lavaron las placas y se secaron a temperatura ambiente, en cada pozo se depositó una gota glicerol tamponado y se cubrió con láminas cubreobjetos para ser examinadas bajo un microscopio de fluorescencia a una longitud de onda de 560 nm. La interpretación de los resultados de la IFI se hizo según el protocolo de diagnóstico recomendado por el Instituto Nacional de Salud de Colombia (Ministerio de la Protección Social & Instituto Nacional de Salud, 2013), en el cual se considera que un animal está infectado cuando tienen lecturas de fluorescencia en suero a una titulación igual o mayor a 1:32.

## **5.6. Identificación genética las especies de parásitos tripanosomatídeos a partir de muestra sanguínea de mamíferos y flebotomíneos no ingurgitados.**

### **5.6.1. Amplificación de la región conservada del minicirculo del kinetoplasto de los parásitos tripanosomatídeos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Con el fin de detectar la presencia de ADN de parásitos del género *Leishmania* en mamíferos y los flebotomíneos, se realizó una PCR convencional, en la cual, se utilizaron los cebadores 13A: 5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3' y 13B: 5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3', descritos por (Rodgers et al., 1990), que delimitan un fragmento de ~ 120 pb de la región conservada del minicirculo del kinetoplasto en todos los parásitos Kinetoplastidos. Este blanco genético presenta entre 10.000 y 20.000 copias en un solo parásito, ofreciendo la capacidad de detectar parásitos en muestras biológicas con bajo número de flagelados, lo que le aporta una alta sensibilidad a la prueba, además, la secuencia de este blanco molecular permite discriminar entre especies del género *Leishmania* (Akhoundi et al., 2017; Chena et al., 2013; Lachaud et al., 2002)

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 µl y se usaron las siguientes condiciones en la mezcla de reacción: búfer 5X Colorless GoTaq® Flexi a 1X, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM, dNTP a 0.2 mM de cada uno, cebadores 13A-13B a 0,4 µM, y de polimerasa GoTaq® DNA polymerase (Promega) 0.75 unidades. Como control positivo se utilizó ADN de cepas de referencia de *Leishmania* (*Le. guyanensis* MHOM/CO/1984/Lguy) y como control negativo se usó agua ultrapura. El perfil térmico empleado fue: desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación, compuestos de una etapa de desnaturalización a 95°C por 40 segundos, alineamiento de cebadores a 59,3 °C por 40

segundos, extensión a 72°C por 8 segundos y finalmente una extensión final a 72° C durante 5 minutos.

### **5.6.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa**

Los productos de amplificación obtenidos mediante PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con previa adición de la tinción fluorescente para ácidos nucleicos GelStar®, para ello 4uL del producto de PCR se mezclaron con 3uL de búfer de carga y se sometió a electroforesis horizontal en búfer TBE 0.5X a 80 voltios durante 55 minutos. La fotodocumentación de los geles se hizo con un transiluminador Visi-Blue UVP Systems. El tamaño de los amplicones se determinó con ayuda del programa Quantum que fue calibrado con base en la longitud recorrida por las diferentes bandas de un marcador de peso molecular Promega 100pb DNA Ladder.

### **5.6.3. Caracterización genética de los parásitos tripanosomátideos mediante secuenciación y análisis filogenético de la región conservada de los minicírculo del Kinetoplasto.**

Los amplicones del fragmento de interés (región conservada del minicírculo) fueron secuenciados en ambos sentidos de la cadena de nucleótidos empleando los mismos cebadores de la reacción original, este procedimiento fue realizado con el sistema de electroforesis capilar ABI 3730 y fue contratado en la compañía MacroGen Inc. Los electroforegramas obtenidos fueron ensamblados y editados automáticamente con el programa Geneious® Versión 9 (Kearse et al., 2012), posteriormente fueron revisados de forma manual y se realizó la verificación de cada sitio polimórfico para obtener una secuencia consenso por cada muestra. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias depositadas en GenBank mediante el programa Blast (Basic Local Alignment

Search 38 Tool) (Altschul et al., 1990), después se descargaron 12 secuencias de especies de referencia del género *Leishmania*, las cuales se alinearon con las secuencias obtenidas durante el estudio. El alineamiento se realizó con ayuda del programa MAFFT (Katoh & Standley, 2013). Posteriormente se determinó el modelo de sustitución que mejor explicara el patrón de polimorfismo observado en las secuencias, finalmente se realizaron las reconstrucciones filogenéticas con el método de máxima verosimilitud, con el programa PhyML (Guindon et al., 2010), estos análisis fueron realizados en el programa Geneious® Versión 9 (Kearse et al., 2012).

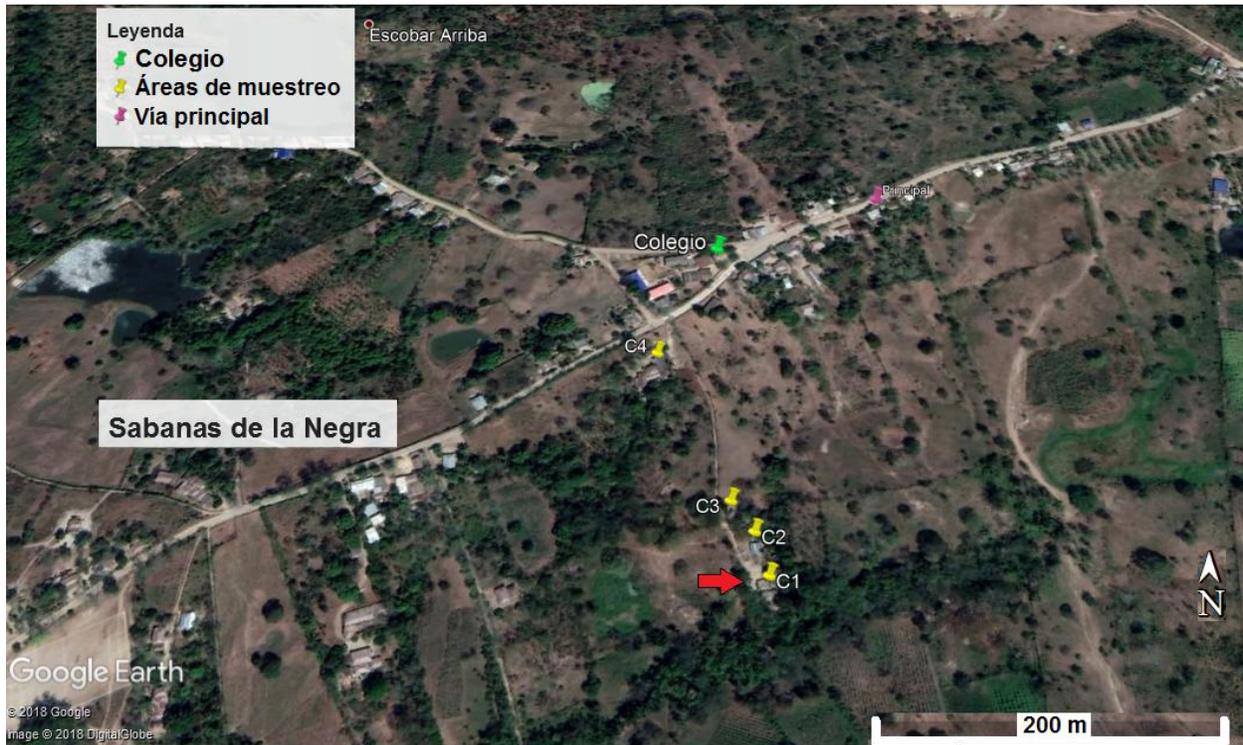
### **5.7. Estimación de frecuencia de infección con *Leishmania* spp. en vertebrados y flebotomíneos.**

Luego de conocer la identidad de la especie del parásito que infectaba de forma natural a flebotomíneos y mamíferos, se calculó la frecuencia de infección para cada especie. Para ello se dividió el número de flebotomíneos/vertebrados en los que se identificó el parásito, entre el número de individuos total de la especie evaluada, el resultado se multiplicó por 100. En el caso de los insectos se estimó la frecuencia mínima de infección, asumiendo que por cada grupo de insectos colocados en microtubos, hay al menos un flebotomíneo positivo.

## RESULTADOS

### 6.1. Determinación de la diversidad y la actividad nocturna de los flebotómicos del género *Lutzomyia*, asociados a la aparición del primer brote de leishmaniasis visceral en Sabanas de La Negra, área rural del municipio de Sampués.

En el corregimiento Sabanas de la Negra, la zona de muestreo involucró cuatro casas (tachuelas amarillas en la Fig. 5) de las cuales la casa número uno (C1, indicada con una flecha roja en la fig. 5), es el domicilio donde se presentó el caso de LV en el menor de edad; los lugares de muestreo están cerca de un relicto de bosque como se puede ver en la siguiente figura.



**Figura 5.** Corregimiento Sabanas de La Negra y área de muestreo de mamíferos.

### 6.1.1. Diversidad de los flebotómíneos del género *Lutzomyia*.

Se capturaron 328 flebotómíneos, con una riqueza específica (S) de seis (6) especies (Fig. 6), el 62,2 % hembras y el 37,8 % machos para una proporción 2:1; *Lu. evansi* fue la especie más abundante (82,9 %), seguida de *Lu. panamensis* (9,8 %), *Lu. c. cayennensis* (4,27 %), *Lu. gomezi* (1,83 %), *Lu. dubitans* (0,61%) y *Lu. rangeliana* (0.61%) (Tabla 2).

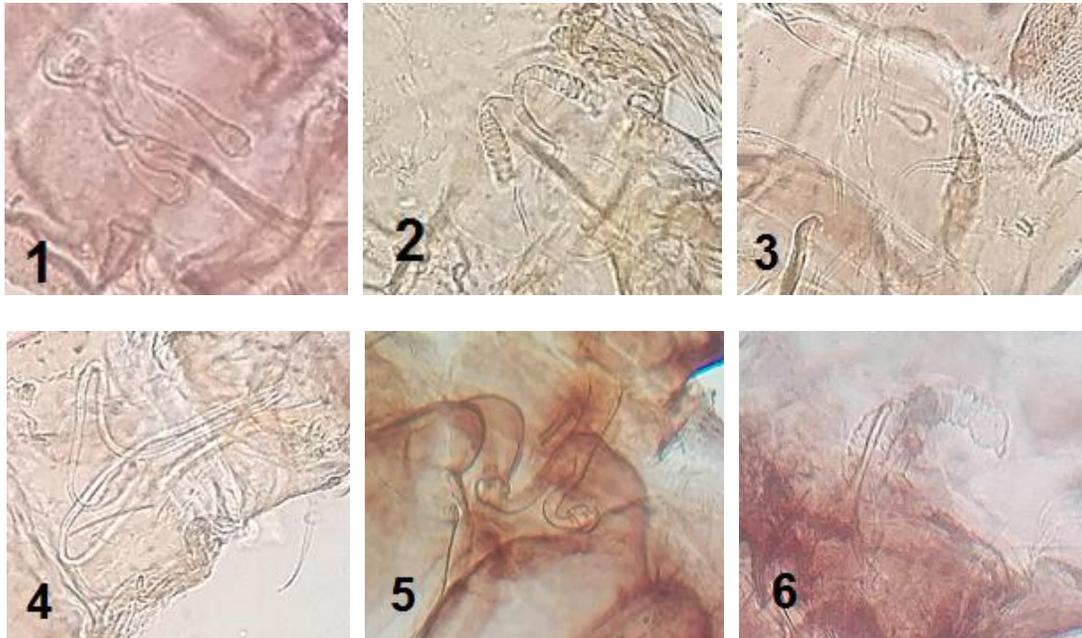


Figura 6. Espermatecas de las especies del género *Lutzomyia* presentes en Sabanas de La Negra, Sampedra.

(1) *Lu. evansi*, (2) *Lu. panamensis*, (3) *Lu. c. cayennensis*, (4) *Lu. gomezi*, (5) *Lu. dubitans*, (6) *Lu. rangeliana*.

(Daniel Guzman)

Por otra parte, se determinó un índice de Dominancia (D) de 0,70 y un índice de Diversidad de especies (1-D) de 0,30, valores que indican que en la zona estudiada predomina una especie: *Lu. evansi*, como se puede apreciar en la siguiente tabla.

**Tabla 2. Fauna flebotomínea del corregimiento Sabanas de la Negra, muestreada con trampas tipo CDC.**

No.	Especies de Flebotomíneos	♂	♀	Abundancia absoluta	Frecuencia (%)	% según área de captura		
						I	P	E
1	<i>Lu. evansi</i>	114	158	272	82.9	2.5	70.9	26.6
2	<i>Lu. panamensis</i>	10	22	32	9.8	13.6	72.7	13.7
3	<i>Lu. c. cayennensis</i>	0	14	14	4.27	21.5	7.1	71.4
4	<i>Lu. gomezi</i>	0	6	6	1.83	0	16.7	83.3
5	<i>Lu. dubitans</i>	0	2	2	0.61	0	50	50
6	<i>Lu. rangeliana</i>	0	2	2	0.61	50	0	50
Total	6 especies	124	204	328	100			

Nota. (I) intradomicilio, (P) peridomicilio y (E) extradomicilio.

En la anterior tabla, se puede observar que, dentro del domicilio se capturaron especímenes de *Lu. evansi*, *Lu. panamensis*, *Lu. c. cayennensis* y *Lu. rangeliana*, mientras que, en el peridomicilio y en el extradomicilio se capturaron individuos de todas las especies identificadas, a excepción de *Lu. rangeliana* que no se recolectó en el peridomicilio. Es importante destacar que en el caso de *Lu. evansi* y *Lu. panamensis* la mayor proporción se observó en el peridomicilio, mientras que las demás fueron más frecuentes en el extradomicilio (fig. 7). En el intradomicilio se encontraron más insectos machos que hembras (71 %), no así en las demás zonas, donde los flebotomíneos hembras fueron más abundantes que los machos; además, dentro del domicilio no se encontraron insectos con ingesta sanguínea a diferencia del peridomicilio donde el número de insectos fue mayor, como podemos observar en la siguiente gráfica.

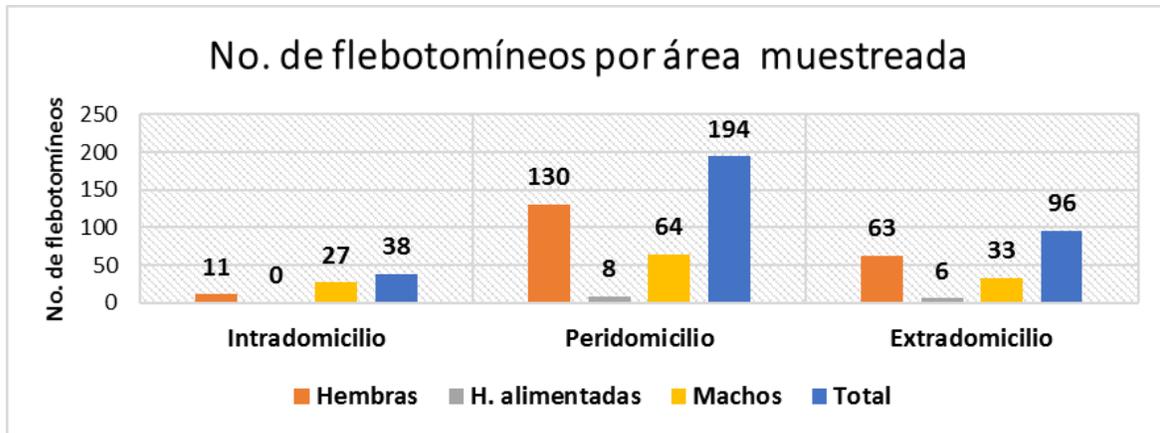


Figura 7. Flebotomíneos en relación al área de muestreo, el sexo y estado de ingesta sanguínea.

### 6.1.2. Determinación de la actividad nocturna de los flebotomíneos del género *Lutzomyia*.

La actividad nocturna de los flebotomíneos hembras del género *Lutzomyia*, reflejó mayor presencia de los flebotomíneos alrededor de la vivienda (peridomicilio) con su mayor pico de actividad a las 23:00 horas (Fig. 8), horario a partir del cual el número de individuos en las capturas fue disminuyendo. En el extradomicilio la hora de mayor actividad fue a las 22:00 horas, sin embargo, se observó un pico previo y de menor actividad a las 19:00 horas; finalmente en el intradomicilio la hora de mayor captura fue a las 23:00 horas, similar al peridomicilio.

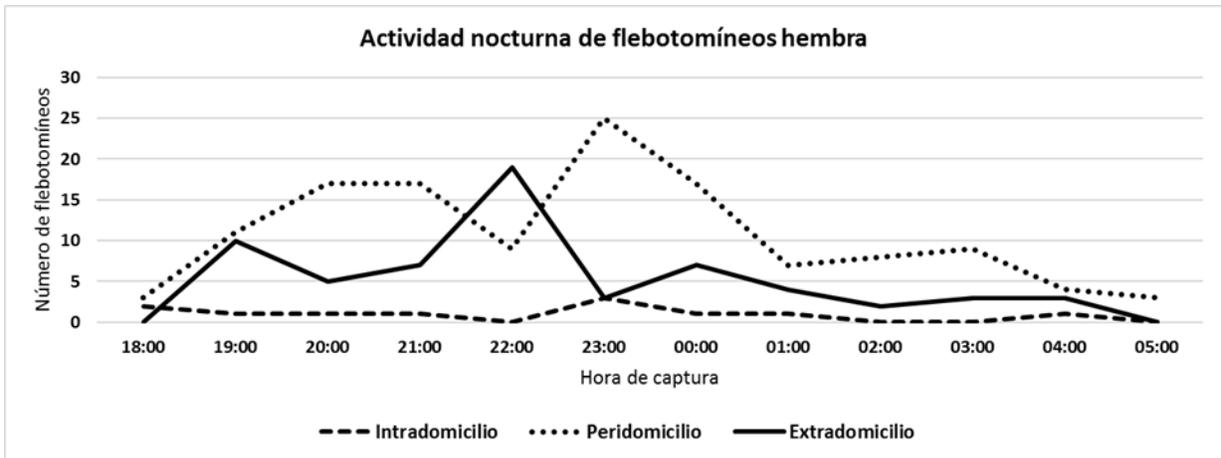


Figura 8. Número de flebotomíneos hembra de acuerdo a la hora y lugar muestreado.

Teniendo en cuenta que *Lu. evansi* fue el flebotomíneo de mayor abundancia en el área de estudio, los mayores picos de actividad de esta especie (Fig. 9), coinciden con las horas mencionadas para la actividad nocturna de los flebotomíneos a nivel general, en cambio a nivel intradomiciliario no se observó una actividad de *Lu. evansi* tan marcada como en las demás áreas de muestreo por el bajo número de especímenes.

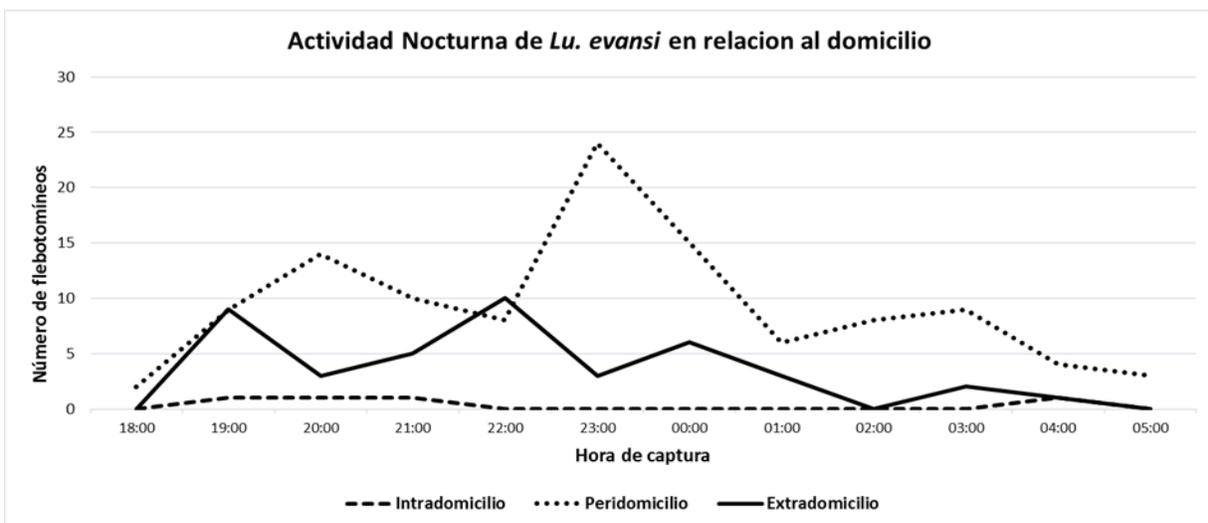


Figura 9. Actividad nocturna de *Lu. evansi* en relación al área de captura.

Por otro lado, los factores climáticos como la humedad relativa y la temperatura fueron en promedio de 96.75% y de 26.3°C respectivamente. Luego de comprobar que se cumpliera el supuesto de normalidad en los datos de los flebotomíneos capturados y variables climáticas, se procedió a realizar la prueba de correlación de Pearson la cual mostró que no había una relación lineal entre la abundancia de los individuos recolectados con la humedad relativa ( $r: 0,24$ ,  $p$ -valor: 0,46) (Fig. 10) y tampoco con la temperatura promedio por hora ( $r: 0,14$ ,  $p$ -valor: 0,66). Asimismo, no se observó una dependencia lineal entre las variables ambientales de humedad relativa ( $r: 0,28$ ,  $p$ -valor: 0,38) y temperatura ( $r: 0,07$ ,  $p$ -valor: 0,83) con la abundancia por hora de *Lu. evansi*. La precipitación en la zona fue de 0.0 mm para los días muestreados por lo tanto no se realizó prueba de correlación con esta variable.

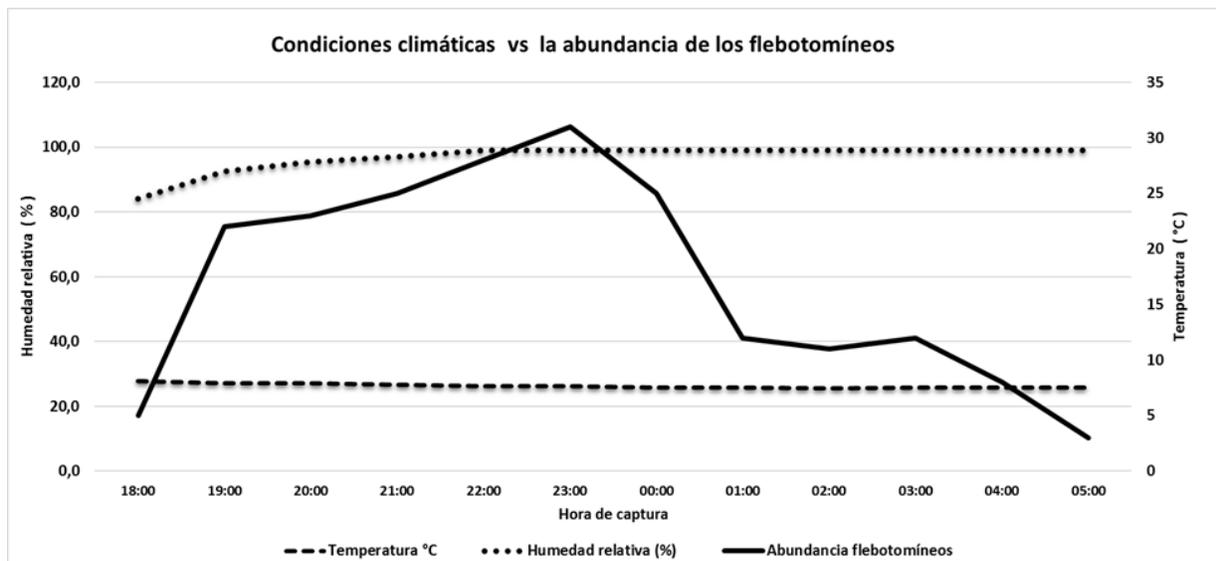


Figura 10. Promedio de la variación de la temperatura, la humedad relativa y la abundancia de los flebotomíneos según hora de captura.

## 6.2. Determinación de la frecuencia de uso de vertebrados como fuentes de ingesta sanguínea para los flebotomíneos.

En total fueron capturados 14 flebotomíneos con residuos de ingesta sanguínea, que equivale a un 4.3 % del total. Éstos se agruparon en cuatro especies: *Lu. evansi* con el mayor número de flebotomíneos ingurgitados con el 78.57 % (11/14) y *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis* y *Lu. dubitans* con el 7.14% (1/14) cada una. De los 14 especímenes analizados se determinó la identidad de la fuente de sangre en 8 individuos, lo que corresponde al 57.14 % del total de las hembras alimentadas. Siete (7) de estas pertenecían a *Lu. evansi* y una (1) a *Lu. gomezi*, mientras que, en las demás especies, no se logró identificar la fuente de la ingesta mediante la PCR múltiple, del mismo modo, la secuenciación de los productos de la PCR con los cebadores universales que amplifican una región conservada del gen Cyt B, no permitió caracterizar la fuente de la ingesta sanguínea debido a que el material amplificado y secuenciado era de los flebotomíneos, aun así, el procedimiento permitió descartar inhibidores de la PCR en las muestras.

En la determinación de la fuente alimenticia de *Lu. evansi*, se detectó el material genético de *Bos taurus* en un 57.14 % (4/7) y de *Capra hircus* en un 14.28 % (1/7); paralelamente, en el 28.57 % (2/7) de *Lu. evansi* se identificó ingesta mixta: 14.28 % (1/7) *Bos taurus* con *Canis familiaris* y el otro 14.28 % (1/7) de *B. taurus* con *C. hircus*. En la ingesta sanguínea de *Lu. gomezi* fue detectado el uso de *B. taurus* (1/1) como fuente de alimento (Tabla 3)

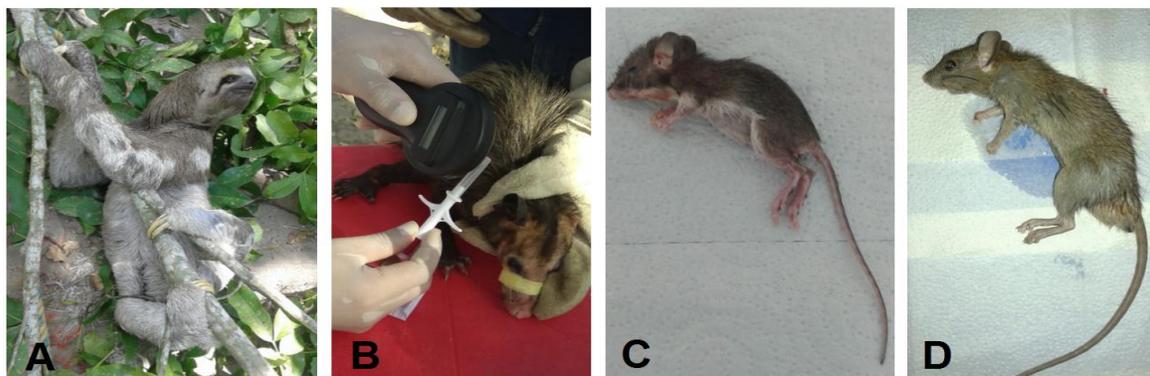
**Tabla 3. Frecuencia de uso de cinco especies de animales domésticos como fuente de ingesta sanguínea.**

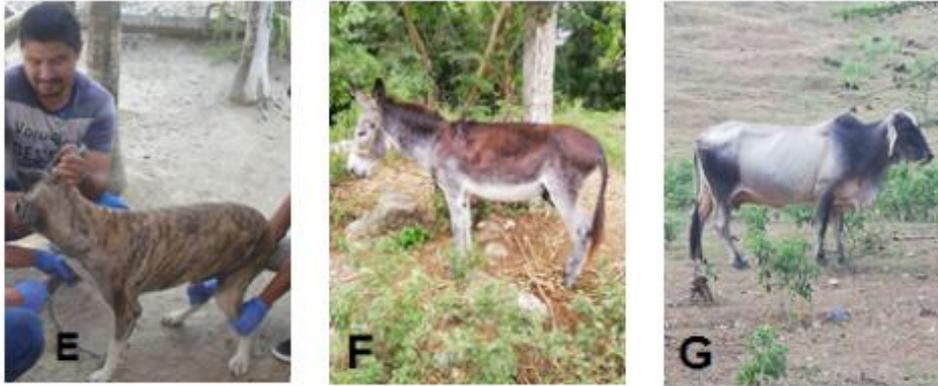
<b>Especie</b>	<b>Ingesta alimenticia</b>	<b>Frecuencia % (n/n)</b>
<i>Lu. evansi</i>	<i>B. taurus</i>	57.14 % (4/7)
<i>Lu. evansi</i>	<i>B. taurus</i> + <i>C. familiaris</i>	14.28 % (1/7)
<i>Lu. evansi</i>	<i>B. taurus</i> + <i>C. hircus</i>	14.28 % (1/7)

<i>Lu. evansi</i>	<i>C. hircus</i>	14.28 % (1/7)
<i>Lu. gomezi</i>	<i>B. taurus</i>	100 % (1/1)

### 6.3. Determinación de la prevalencia de anticuerpos frente a *Leishmania* spp. en animales domésticos, sinantrópicos y silvestres.

Se obtuvieron 34 muestras de sangre entre todos los animales domésticos, sinantrópicos y silvestres, presentes en el foco de leishmaniasis visceral en Sabanas de La Negra. En total se capturaron 11 roedores de dos especies: *R. rattus* con ocho (8) individuos y *Zygodontomys brevicauda* con tres (3) especímenes; para este grupo de mamíferos se obtuvo un éxito de captura del 3.66 %. Entre los animales domésticos analizados hubo cuatro (04) caninos, cuatro (04) bovinos y cuatro (04) equinos. Para el caso de los animales sinantrópicos se capturaron nueve (09) zarigüeyas de la especie *D. marsupialis*, con un éxito de captura del 4,5 % y una tasa de recaptura de 0%. En cuanto a los animales silvestres se capturaron dos osos perezosos de la especie *Bradypus variegatus* (Fig. 11).

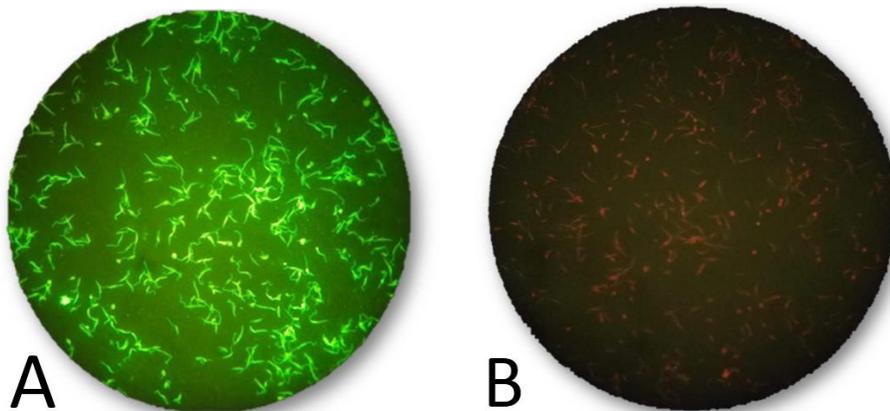




**Figura 11. Especies de mamíferos muestreados en Sabanas de La Negra, Sampués (A) *Bradypus variegatus*; (B) *Didelphis marsupialis*; (C) *Zygodontomys brevicauda*; (D) *Rattus rattus*; (E) *Canis familiaris*; (F) *Equus asinus* y (G) *Bos indicus*. (Daniel Guzmán)**

### **6.3.1. Detección de anticuerpos IgG contra *Leishmania* spp. por inmunofluorescencia indirecta (IFI).**

La detección de anticuerpos contra parásitos del género *Leishmania* (Fig. 12) fue realizada en 23 especímenes, representando así el 67.64 % (23/34) de los mamíferos muestreados (Tabla 4). Paralelo a la identificación de anticuerpos anti-IgG contra *Leishmania* spp., se realizó una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) diferencial, para identificar posibles falsos positivos por reacción cruzada con flagelados del género *Trypanosoma*.



**Figura 12. Interpretación de la IFI contra IgG anti-*Leishmania* y Anti-*Trypanosoma* spp.**

(A). IFI positiva (B). IFI negativa. Vista a 100 X. (Daniel Guzmán)

**Tabla 4. Prevalencia de anticuerpos frente a *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp., detectados mediante IFI a una dilución de suero de 1/32 en mamíferos muestreados en Sabanas de La Negra, Sampedra.**

Vertebrados	No. muestras	Seropositividad	
		Anti- <i>Leishmania</i>	Anti- <i>Trypanosoma</i>
Roedores	11	9.09% (1/11)	18.18% (2/11)
Equinos	4	50% (2/4)	75 % (3/4)
Caninos	4	50% (2/4)	0 % (0/4)
Bovinos	4	0 % (0/4)	100 % (4/4)

**Tabla 5. Mamíferos seropositivos para anticuerpos contra *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp.**

Mamíferos	<i>Leishmania</i> spp	<i>Trypanosoma</i> spp	Interpretación
Roedor 8	Negativo	1/32	+ <i>Trypanosoma</i> spp.
Roedor 10	1/32	Negativo	+ <i>Leishmania</i> spp
Roedor 11	Negativo	1/32	+ <i>Trypanosoma</i> spp.
Equino 2	Negativo	1/32	+ <i>Trypanosoma</i> spp.
Equino 3	1/64	1/32	+ tripanosomatídeos
Equino 4	1/64	1/64	+ tripanosomatídeos
Canino 1	1/64	Negativo	+ <i>Leishmania</i> spp
Canino 4	1/64	Negativo	+ <i>Leishmania</i> spp
Bovino 1	Negativo	1/64	+ <i>Trypanosoma</i> spp.
Bovino 2	Negativo	1/64	+ <i>Trypanosoma</i> spp.
Bovino 3	Negativo	1/128	+ <i>Trypanosoma</i> spp.
Bovino 4	Negativo	1/128	+ <i>Trypanosoma</i> spp.

Nota. signo más (+) es IFI positiva.

De los 11 roedores evaluados por IFI, el 9.09% (1/11) presentó títulos de anticuerpos frente a *Leishmania* spp. a una dilución del suero 1:32 (IFI positivo). La muestra del roedor seropositivo fue de *R. rattus*, no presentó reactividad con los antígenos totales de los parásitos del género *Trypanosoma*. En los equinos (Tabla 5) la seropositividad fue del 50% (2/4), asimismo, estos individuos también fueron reactivos en la IFI diferencial con antígenos de *Trypanosoma* spp.

En los caninos evaluados, el 50% (2/4) fueron seropositivos frente a *Leishmania* spp., en contraste, ninguno mostró reactividad contra antígenos de *Trypanosoma* spp.

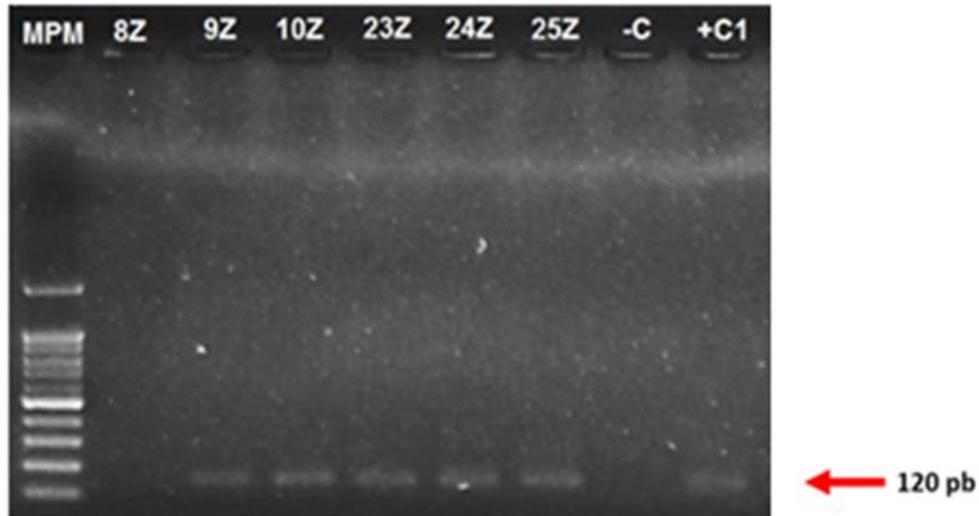
Los bovinos en su totalidad no presentaron reactividad a títulos 1:32 por lo que no se consideraron seropositivos, ya que esta fue solo a títulos de 1:16, en cambio, el 100% de los mismos si fueron seropositivos frente a *Trypanosoma* spp., con titulaciones por encima de 1:64.

#### **6.4. Identificación genética las especies de parásitos tripanosomatídeos a partir de muestra sanguínea de mamíferos y flebotomíneos no ingurgitados.**

##### **6.4.1. Amplificación de la región conservada del minicirculo del kinetoplasto de los parásitos tripanosomatídeos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Luego de realizar la PCR con los cebadores 13A - 13B y visualizar los productos mediante electroforesis (Fig. 13), se pudo observar la banda de aproximadamente 120 pb en muestras de bovinos (4/4, 100%), caninos (4/4, 100%), equinos (4/4, 100%), roedores (10/11, 90.90%), zarigüeyas (7/9, 77.7%) y osos perezosos (2/2, 100%). Los resultados de la visualización de los productos de la PCR en los flebotomíneos se observan en la tabla 6.

En el cual el 75.6% de los grupos de insectos hembras conformados mostraron la banda esperada, considerando que por lo menos un espécimen de cada grupo estaba infectado.



**Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa del ADNk de tripanosomatídeos.**

El fragmento esperado corresponde con lo observado en los amplicones de 120 pb amplificados por PCR con los cebadores 13A y 13B. (MPM) marcador de peso molecular, (8Z) muestra negativa, (9Z-25Z) muestras positivas, (-C) control negativo, (+C1) control positivo, ADN de *Le. guyanensis*.

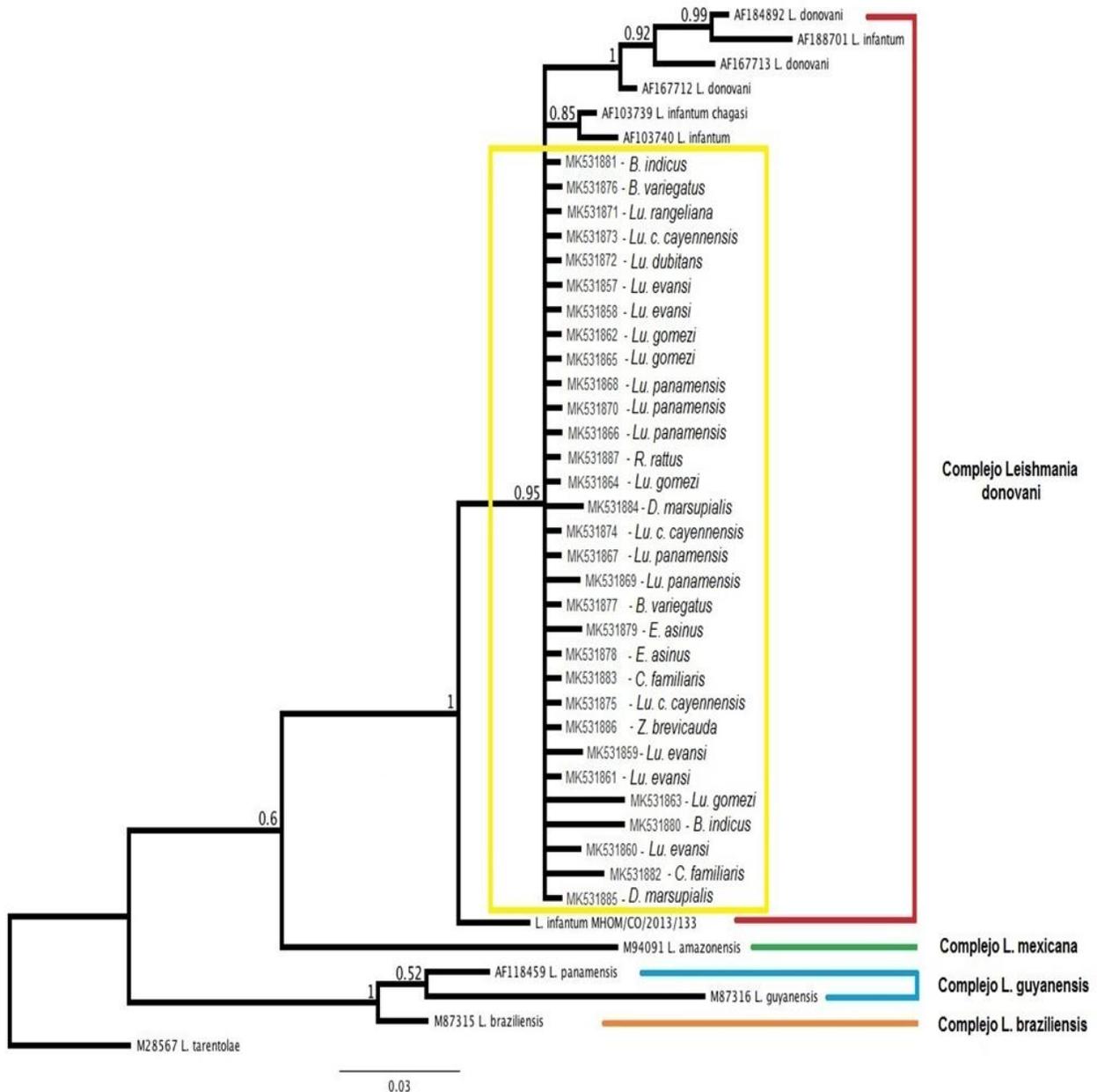
**Tabla 6. Especies de flebotomíneos y resultados de PCR de los minicírculos de kinetoplasto con el propósito de detectar parásitos del género *Leishmania*.**

Flebotomíneos	No. de especímenes	No. de grupos formados	No. de grupos con la banda esperada	Frecuencia de infección (%)
<i>Lu. evansi</i>	158	19	14	73,68
<i>Lu. panamensis</i>	22	8	6	75
<i>Lu. c. cayennensis</i>	14	5	3	60
<i>Lu. gomezi</i>	6	5	4	80
<i>Lu. dubitans</i>	2	2	2	100
<i>Lu. rangelifiana</i>	2	2	2	100
Total	204	41	31	75,6

#### **6.4.2. Caracterización genética de los parásitos tripanosomatídeos mediante secuenciación y análisis filogenético de la región conservada de los minicírculo del Kinetoplasto.**

Con el objetivo de caracterizar genéticamente la especie de parasito infectante, se llevó a cabo un proceso de secuenciación en ambos sentidos de los amplicones obtenidos por PCR del minicírculo del kinetoplasto. En total se escogieron 31 muestras que exhibieron bandas que en la electroforesis presentaron buena intensidad, también se tuvo en cuenta que representaran a todas las especies analizadas en el estudio. Luego de la secuenciación y la edición de los electroforegramas se obtuvieron 31 secuencias consenso de 115 pb, las cuales fueron alineadas con 12 secuencias de nucleótidos de la región conservada de los minicírculos del kinetoplasto de siete (07) especies de parásitos del género *Leishmania*. Puesto que los resultados preliminares obtenidos con la herramienta Blast, indicaron que se trataba de especies de este taxón.

A partir de la topología del árbol filogenético se pudo apreciar que las secuencias recuperadas tanto de insectos como de mamíferos se agruparon con especies del complejo *Le. donovani* (cuadro amarillo en la figura 14), cuyo único representante en América es *Le. Infantum*, teniendo en cuenta los altos valores de soporte de rama (95%) se puede inferir que las secuencias nucleotídica recuperadas corresponden a *Le. infantum*.



**Figura 14. Análisis filogenético de la región conservada del minicírculo del kinetoplasto de las especies del género *Leishmania*.**

El análisis se realizó a partir de 43 secuencias de nucleótidos, en total se analizaron 115 posiciones, el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajusta a la diversidad observada fue Jukes-Cantor 1969 (JC69), el método usado

para hacer la reconstrucción filogenética fue máxima verosimilitud y se llevó a cabo en el programa Geneious® Versión 9 (Kearse et al., 2012).

**Tabla 7. Códigos asignados por GenBank a los fragmentos de la región conservada de los minicírculos del kinetoplasto de *Le. infantum* junto con sus hospederos.**

<b>ID</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Organismo identificado</b>	<b>Código de registro</b>
LECSSAM1	<i>Lu. evansi</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531857
LECSSAM2	<i>Lu. evansi</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531858
LECSSAM20	<i>Lu. evansi</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531859
LECSSAM25	<i>Lu. evansi</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531860
LECSSAM33	<i>Lu. evansi</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531861
LGCSSAM18	<i>Lu. gomezi</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531862
LGCSSAM34	<i>Lu. gomezi</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531863
LGCSSAM47	<i>Lu. gomezi</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531864
LGCSSAM82	<i>Lu. gomezi</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531865
LPCSSAM6	<i>Lu. panamensi</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531866
LPCSSAM24	<i>Lu. panamensi</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531867
LPCSSAM26	<i>Lu. panamensi</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531868
LPCSSAM38	<i>Lu. panamensi</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531869
LPCSSAM32	<i>Lu. panamensi</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531870
LRCSSAM19	<i>Lu. rangeliana</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531871
LDCSSAM31	<i>Lu. dubitans</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531872
LCCSSAM60	<i>Lu. c. cayennensis</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531873
LCCSSAM81	<i>Lu. c. cayennensis</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531874
LCCSSAM86	<i>Lu. c. cayennensis</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531875
BVCSSAM12	<i>B. variegatus</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531876
BVCSSAM33	<i>B. variegatus</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531877
EACSSAM7	<i>E. asinus</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531878
EACSSAM17	<i>E. asinus</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531879
BICSSAM14	<i>B. indicus</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531880
BICSSAM13	<i>B. indicus</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531881
CFCSSAM2	<i>C. familiaris</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531882
CFCSSAM5	<i>C. familiaris</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531883
DMCSSAM24	<i>D. marsupialis</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531884
DMCSSAM30	<i>D. marsupialis</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531885
RODCSSAM22	<i>Z. brevicauda</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531886
RODCSSAM11	<i>R. rattus</i>	<i>Le. infantum</i>	MK531887

### 6.5. Estimación de frecuencia de infección con *Leishmania* spp. en vertebrados y flebotomíneos.

En todas las especies del género *Lutzomyia* capturadas en La Negra se encontró *Le. infantum*, dentro de estas, *Lu. evansi* presentó una frecuencia mínima de infección del 3,2% (tabla 8), valor que es menor que el obtenido para *Lu. panamensis* o *Lu. c. cayennensis* y otros flebotomíneos evaluados.

**Tabla 8. Frecuencia mínima de infección con *Le. infantum* en flebotomíneos de Sampués.**

Flebotomíneos	No. de especímenes	No. grupos formados	No. de grupos secuenciados	Frecuencia mínima de infección (%)
<i>Lu. evansi</i>	158	19	5	3.2
<i>Lu. panamensis</i>	22	8	5	22.7
<i>Lu. c. cayennensis</i>	14	5	3	21.4
<i>Lu. gomezi</i>	6	5	4	66.6
<i>Lu. dubitans</i>	2	2	1	50
<i>Lu. rangeliana</i>	2	2	1	50
<b>Total</b>	204	41	19	

Respecto a los mamíferos, los resultados mostraron infección con la misma especie de parásito encontrada en los insectos (tabla 9), resaltando en ellos a los caninos y a las zarigüeyas los cuales están incriminados como los reservorios domésticos y sinantrópicos-silvestres, respectivamente.

**Tabla 9. Frecuencia de infección con *Le. infantum* en mamíferos de Sampués.**

Vertebrados	Especie	No. de especímenes	No. de muestras secuenciadas	Tasa de infección (%)
<b>Caninos</b>	<i>C. familiaris</i>	4	2	<b>50</b>
<b>Equinos</b>	<i>E. asinus</i>	4	2	<b>50</b>
<b>Bovino</b>	<i>B. indicus</i>	4	2	<b>50</b>

<b>Zarigüeyas</b>	<i>D. marsupialis</i>	9	2	<b>22,2</b>
<b>Roedores</b>	<i>R. rattus</i>	8	1	<b>12,5</b>
	<i>Z. brevicauda</i>	3	1	<b>33,3</b>
<b>Perezosos</b>	<i>B. Variegatus</i>	2	2	<b>100</b>
<b>Total</b>	<b>7 especies</b>	<b>34</b>	<b>12</b>	<b>35,3</b>

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se encontró evidencia entomológica que indica la presencia de insectos infectados con *Le. infantum* en el domicilio y sus alrededores, con un vínculo epidemiológico con animales domésticos, sinantrópicos y silvestres, soportado por las fuentes de ingesta. Adicionalmente, el hallazgo de material genético de *Le. infantum* en los animales domésticos y sinantrópicos sugiere un flujo de los parásitos desde los relictos de bosque hacia el domicilio, lo que sugiere la existencia de un nuevo ciclo doméstico rural de leishmaniasis visceral en el corregimiento de Sabanas de La Negra, Sampués, Sucre.

En primer lugar, en términos de diversidad, dentro las seis especies encontradas en Sabanas de La Negra, *Lu. evansi* fue el flebotomíneo encontrado en mayor abundancia, lo cual es coherente con el tipo de foco caracterizado; este insecto está incriminado como el vector principal de *Le. infantum* en el Caribe Colombiano (Cortés Alemán et al., 2009; Bruno L. Travi et al., 1996), y se ha sugerido que este flebotomíneo podría participar en el mantenimiento del ciclo epidemiológico de la leishmaniasis cutánea, en el norte del país (Bejarano et al., 2012). La abundancia de *Lu. evansi* en la zona estudiada en Sabanas de La Negra (82.9 %), mostró una tendencia similar a otras áreas muestreadas de la región Caribe, donde esta especie de flebotomíneo representa la mayoría de insectos colectados, con porcentajes de captura que puede llegar a 97,2% (Cortés Alemán et al., 2009; Cortés & Fernández, 2008; Luís E. Paternina et al., 2016; A. Pérez-Doria et al., 2008; Romero et al., 2013).

Los insectos *Lu. panamensis* y *Lu. gomezi* encontrados en porcentajes de 9.8% y 1.8% respectivamente, exhiben al igual que *Lu. evansi* tendencias antropofílicas (Cortés Alemán et al., 2009), además, tienen una amplia distribución en la costa Caribe, por ejemplo, en áreas rurales

periurbanas y urbanas del municipio de Sincelejo, donde, *Lu. panamensis* y *Lu. gomezi* se encontraron con frecuencias del 19.1% y 10.5%, respectivamente (Bejarano et al., 2002; Lambraño Cruz et al., 2012); epidemiológicamente estos flebotomíneos están implicados en la transmisión de la LC, actuando como posibles vectores de los parásitos causantes de esta forma de la enfermedad, como *Le. braziliensis* en Venezuela y *Le. panamensis* en Panamá, asimismo en Colombia estos flebotomíneos fueron incriminados como vectores de *Le. panamensis* en el departamento de Boyacá (Christensen et al., 1983; Sandoval et al., 2014; Santamaría et al., 2006; Vásquez-Trujillo et al., 2008).

Dada la mencionada relación de *Lu. panamensis* y *Lu. gomezi* con *Le. panamensis* en otras áreas geográficas del país, se pone de manifiesto que en el municipio de Sampués se ha informado la presencia de *Le. panamensis* en aislados clínicos de personas diagnosticadas con LC (L. P. Martínez et al., 2010), lo que representa un riesgo latente en la transmisión de este parásito en el área estudiada, dada la posible movilidad de personas infectadas con *Le. panamensis* a este corregimiento y la presencia de mamíferos incriminados como potenciales reservorios de *Le. panamensis* como los perezosos de las especies *C. hoffmanni* y *B. variegatus* (Muñoz-garcía et al., 2019; Organización Mundial de la Salud, 2010).

*Lu. c. cayennensis*, *Lu. rangeliana* y *Lu. dubitans*, fueron encontradas en bajo porcentaje, 4.3 %, 0.6 % y 0.6 % respectivamente; la abundancia de los anteriores flebotomíneos, es similar a los registrados en estudios llevados a cabo en el municipio de Sincelejo, donde se les capturó en bajo porcentaje (Bejarano et al., 2002; A. J. Pérez-Doria et al., 2006); por otro lado, a *Lu. c. cayennensis* se le ha encontrado frecuentemente sobre las paredes al interior de las viviendas, y en grandes densidades pueden atacar a los humanos (James Montoya-Lerma & Ferro, 1999), asimismo, a *Lu. dubitans* también se le ha encontrado picando a los humanos, aun así, a los anteriores

flebotomíneos no se les ha implicado en la epidemiología de la leishmaniasis y por ello no tienen importancia médica (Cortés & Fernández, 2008).

En cuanto al conocimiento de la actividad nocturna de los flebotomíneos del género *Lutzomyia*, asociados a la aparición del primer brote de leishmaniasis visceral en Sabanas de La Negra, se ha planteado que este conocimiento es indispensable para el diseño de las medidas de control vectorial de la enfermedad, en este sentido se encontró que los insectos presentaron un periodo de actividad en aumento desde las 18:00 hasta las 23:00 con su máxima actividad en esta última hora, a partir de la cual el número de insectos capturados fue decreciendo, datos que son similares a los registrados en el municipio del Carmen de Bolívar, departamento de Bolívar (Cortés & Fernández, 2008); por otro lado, la actividad de los flebotomíneos en Sabanas de la Negra, presenta leves variaciones en relación al domicilio, en tal caso el máximo pico de actividad en el interior del domicilio fue a las 23:00 horas, similar al peridomicilio, mientras en el extradomicilio el pico más alto fue a las 22:00, una hora antes; en este periodo de tiempo el riesgo para los humanos y animales que están presentes en las viviendas y sus alrededores es mayor, por lo que se recomienda el uso de prendas de vestir y repelentes que reduzcan el contacto humano-vector; así mismo, el uso de toldillos con insecticidas podría tener algún efecto protector, puesto que los infantes son enviados a dormir a partir de las ocho de la noche aproximadamente.

Por otro lado, en este estudio se observó que variables ambientales como la temperatura y la humedad relativa, durante los tres días de muestreo, no presentaron una correlación con la actividad nocturna de los flebotomíneos, esta observación, es similar a lo informado por un estudio realizado en el departamento de Boyacá (D. Martínez et al., 2018); sin embargo, la asociación de la abundancia de los flebotomíneos podría variar por cambios ambientales más notables, generados por las temporadas de alta precipitación que se presentan durante un año, como lo dieron a conocer

estudios realizados en el departamento de Bolívar y Cundinamarca, donde sí encontraron una correlación significativa entre variables climáticas y la abundancia mensual de los flebotomíneos (Cortés & Fernández, 2008; Ferro et al., 2015).

En cuanto a la frecuencia de uso de vertebrados como fuente de ingestas sanguíneas de los insectos del género *Lutzomyia*, se encontró el uso de tres de las cinco especies de animales domésticos analizadas y presentes en el área, entre los cuales, los bovinos fueron los más frecuentes en *Lu. evansi* con 85.7 %, incluyendo las ingestas mixtas, le siguió los caprinos en un 28.57 % y por último los caninos con una frecuencia de uso de 14,28 %. Estos hallazgos son consistentes con los resultados de investigaciones realizadas en el departamento de Sucre, en el que los bovinos (*B. taurus*) son la principal fuente de sangre para estos insectos (Luís E. Paternina et al., 2016; Paternina Tuiran, 2012); así mismo, en el departamento de Bolívar y Córdoba se encontró a *Lu. evansi* usando principalmente animales domésticos como fuentes de alimento como los caninos (*C. familiaris*), bovinos (*B. taurus*), porcinos (*S. scrofa*), ovinos (*O. aries*) y aves de corral (*Gallus gallus*), y al igual que lo encontrado en Sucre, en estas investigaciones *Lu. evansi* también tomó como fuente de alimento a humanos (González et al., 2018; L. Martínez, 2018). Las similitudes observadas entre estos estudios, revelan un comportamiento ecléctico que le permite a *Lu. evansi*, aprovechar los ambientes modificados por el hombre, como lo siguieren otros estudios relacionados en hbitad (Bruno L. Travi et al., 2002).

El 42.8% (6/14) restante de los especímenes de *Lu. evansi*, *Lu. panamensis* y *Lu. dubitans* que fueron encontrados alimentados, y en los que no fue posible determinar la fuente de la ingesta, puede ser atribuido a la posible alimentación de otros vertebrados presentes en la zona de estudio y que no fueron incluidos en la PCR múltiple como perezosos, zarigüeyas, murciélagos, gallinas entre otros animales.

El papel de los animales domésticos en la epidemiología de la leishmaniasis visceral, solo es bien conocido para los caninos, quienes están incriminados como los principales reservorios domésticos de *Le. infantum* (Gharbi et al., 2015; Organización Panamericana de la Salud, 2019b; Ramírez et al., 2016; Reale et al., 1999; Rivero Rodríguez et al., 2018; Tovar A & Yasnot A, 2017; Zambrano-Hernandez et al., 2015), mientras que el papel de los bovinos y caprinos aún no está claro, sin embargo, algunos estudios realizados fuera del territorio colombiano han encontrado a bovinos y caprinos infectados naturalmente con *Le. infantum* y plantean la posibilidad que estos animales puedan ser potenciales reservorios de este parásito, no obstante, aclaran que es necesario determinar si estos animales son infectivos para los flebotómíneos, para poder incriminarlos como reservorios del parásito (Gao et al., 2015; Han et al., 2018; Paixão-Marques et al., 2019; Singh et al., 2013).

En cuanto a la seroprevalencia de la enfermedad en los vertebrados, la seropositividad del 50% (2/4) obtenido en los caninos de Sabanas de La Negra, fue coherente con lo observado en estudios realizados en áreas rurales del departamento de Sucre, en los municipios de Sincelejo, Sampués y Ovejas, con una seroprevalencia que va del 55.5 % al 72 %; estos resultados permiten confirmar la importancia de *C. familiaris* en los ciclos de transmisión de Leishmaniasis visceral en el departamento (Paternina Tuirán et al., 2016).

Para el caso de los roedores, fue posible determinar una seroprevalencia de anticuerpo contra *Leishmania spp.* de 12,5% (1/8) en *R. rattus*, (en la que se descartó reacción cruzada con parásitos del género *Trypanosoma* mediante IFI diferencial), lo cual es consistente con estudios previos realizados en el municipio de Ovejas, en el que también se encontraron anticuerpos contra

*Leishmania* spp., en *R. rattus*, en un porcentaje de 4,34% (1/23) (Canchila Muñoz & Contreras Gomez, 2016), de igual forma, estos resultados son coherentes con los obtenidos en Chipre, donde se halló una prevalencia de anticuerpos contra *Le. infantum* del 11,2% (17/152) en esta especie de roedor (Psaroulaki et al., 2015). La especie *R. rattus* es considerada como reservorio de parásitos del género *Leishmania* (Organización Panamericana de la Salud, 2019b). Estos mamíferos no solo se les ha encontrado infectados con *Leishmania* spp., sino que también son infectivos para los flebotomíneos incriminados como vectores; además, pueden mantener la infección en ausencia de los caninos (Ferreira et al., 2015; Millán et al., 2014). Lo cual representa un riesgo para la zona bajo estudio.

Los resultados negativos obtenidos en las pruebas serológicas de los bovinos, contrastan con lo observado en otros países como Bangladesh y Sudan, donde sí detectaron anticuerpos contra parásitos del género *Leishmania* con valores de seroprevalencia del 9.4% (13/138) y del 21.4%, respectivamente (Alam et al., 2011). A pesar de los resultados serológicos negativos, los bovinos en Sabanas de la Negra, fueron hallados infectados con *Leishmania* spp mediante métodos moleculares, lo que podría indicar una infección reciente. Aunque los bovinos, se encuentran dentro de los animales que hacen parte de los escenarios de transmisión de la leishmaniasis, son mamíferos en los que poco se ha estudiado la infección, aun así, algunos investigadores han sugerido que estos animales podrían participar en el ciclo epidemiológico de la leishmaniasis y no se debe descartar *a priori* su posible participación, pues los resultados de las fuentes de ingesta indican que sirven de soporte a las poblaciones de insectos vectores (Alam et al., 2011; Bern, Courtenay, & Alvar, 2010; Svobodová et al., 2009) y en el viejo mundo se ha aislado *Le. siamensis* (Lobsiger et al., 2010)

El hallazgo de equinos (asnos) que presentaron anticuerpos contra los parásitos del género *Leishmania* (n:2/4), es coherente con lo hallado en áreas donde circula *Le. infantum* en Italia y Portugal, donde se sugirió que estos animales podrían tener participación en la transmisión de la leishmaniasis como potenciales reservorios de *Leishmania* spp (Nardoni et al., 2019; Rodrigues et al., 2019), en contraste a lo anterior, investigadores en Brasil plantearon que los burros no serían un importante reservorio en la transmisión de la leishmaniasis visceral, luego de haber infectado experimentalmente a estos mamíferos con parásitos de la especie *Le. infantum* y no ser infectivos para *Lu. longipalpis* (Cerqueira et al., 2003). Cabe resaltar que los asnos de la zona bajo estudio, no solo presentaron anticuerpos contra el parásito, sino que fue posible la detección del parásito en sangre, esto sumado a los resultados de fuentes de ingesta sanguínea de *Lu. evansi* (Luís E. Paternina et al., 2016), sugiere que estos mamíferos podrían tener un papel en la epidemiología de la enfermedad y debería ser motivo de futuros estudios.

Los resultados serológicos encontrados en los dos equinos de Sabanas de la Negra, quedarían indefinidos sin la implementación de otros métodos diagnósticos como los moleculares, ya que las dos muestras que resultaron positivas contra *Leishmania* spp en titulaciones de 1:64 también fueron reactivas contra antígenos de *Trypanosoma* spp., con titulaciones similares, por lo que podríamos suponer una reacción cruzada o que en los equinos analizados estaría ocurriendo una coinfección con ambos tripanosomatídeos; esta última posibilidad, es apoyada por el hallazgo de por lo menos tres especies de parásitos del género *Trypanosoma*: *T. cruzi*, *T. theileri* y *T. rangeli* en la zona de estudio (datos no publicados, Investigaciones Biomédicas). Lo que resalta la importancia de combinar las técnicas serológicas y las herramientas de biología molecular para la vigilancia epidemiológica de estos parásitos.

Los resultados del análisis filogenético permitieron establecer que *Le. infantum* fue la especie infectante en los flebotomíneos y en los mamíferos, esto es consistente con la etiología del caso de leishmaniasis visceral que se presentó en el corregimiento durante el segundo semestre de 2016 y confirmaría que se trata de un caso autóctono, puesto que en la zona se encuentran todos los actores epidemiológicos necesarios para explicar la aparición del caso, con base en esto se plantea la existencia de un ciclo doméstico rural que involucra a los animales silvestres.

En cuanto a la frecuencia de infección con *Le. infantum* en los flebotomíneos, se encontró una frecuencia mínima del 3.2 % en *Lu. evansi*, lo que concuerda con estudios entomológicos realizados en el departamento de Córdoba, donde se registraron unos porcentajes que varían de 0.03% y 0.42%, en San Andrés de Sotavento, áreas donde la LV es endémica y donde *Lu. evansi* presentó una abundancia del 93%; de igual forma los resultados aquí suministrados, son similares a otras áreas del departamento de Córdoba como el municipio de Sahagún, donde se registró una tasa de infección de 0.22% (González et al., 2018; J. Montoya-Lerma et al., 2003). En áreas donde la LV es endémica en Venezuela, se han registrado porcentajes de infección que varían de 0.15 % a 0.23%, datos que refuerzan el papel de este flebotomíneo en la epidemiología de la enfermedad (Feliciangeli et al., 1999; J. Montoya-Lerma et al., 2003).

El hallazgo de infección natural con *Le. Infantum* en *Lu. panamensis* y *Lu. gomezi* sugiere que estos flebotomíneos podrían estar implicados en el mantenimiento del ciclo epidemiológico de la enfermedad en la zona de estudio. Esta idea es apoyada por la amplia distribución que presentan en el territorio colombiano, y sus tendencias antropofílicas y endofílicas; a diferencia de lo encontrado en Sabanas de La Negra, a *Lu. panamensis* y *Lu. gomezi*, se les ha encontrado infectadas naturalmente con flagelados causantes de leishmaniasis cutánea en Colombia y en otros

países de América, por lo que ha sido implicado en la epidemiología de esta forma de la enfermedad (Cortés & Fernández, 2008; González et al., 2018; Gutiérrez et al., 2014; Santamaría et al., 2006), aunque estos flebotomíneos, pueden sostener la infección de flagelado causantes de LC, no hay registros de infección con *Le. infantum* en estas especies de *Lutzomyia* en el país, razón por la cual este constituye el primer registro de este patógeno en estos vectores.

El hallazgo de *Le. infantum* en *Lu. c. cayennensis*, con una frecuencia mínima de infección del 21.4%, contrasta con lo registrado en la costa norte de Colombia, en donde, se le ha encontrado infectado con *Le. panamensis* en el departamento de Córdoba (González et al., 2018), asimismo, en los Montes de María y San Andrés de Sotavento, estos flebotomíneos se han descrito con otros parásitos tripanosomatídeos no identificados (Suljey Cochero et al., 2007; Cortés Alemán et al., 2009; J. Montoya-Lerma et al., 2003; Bruno L Travi et al., 1996). Por lo tanto, este flebotomíneo tendría una amplia capacidad de infectarse con varias especies de tripanosomatídeos, y eventualmente podría participar el mantenimiento del ciclo zoonótico de estos parásitos, puesto que fueron capturados en el extradomicilio.

La captura de dos especímenes de *Lu. dubitans*, es coherente con otras investigaciones, en las cuales se le ha encontrado en bajo número de individuos en zonas rurales y urbanas del Caribe Colombiano (Hoyos et al., 2009; A. J. Pérez-Doria et al., 2006; Santander et al., 2006). Por otro lado, aunque a *Lu. dubitans* se le ha encontrado picando a los humanos, este flebotomíneo no se le ha registrado infectado con parásitos del género *Leishmania* y tampoco está incriminado en la transmisión de la leishmaniasis (Angulo et al., 2013; Cortés & Fernández, 2008; A. J. Pérez-Doria et al., 2006). Por lo tanto, estos resultados constituyen el primer hallazgo de *Le. infantum* en esta especie, por lo tanto, su presencia y papel en el ciclo epidemiológico de la leishmaniasis deber ser motivo de futuras investigaciones.

*Lu. rangeliana*, con dos especímenes colectados en Sabanas de La negra, al igual que *Lu. dubitans*, muestra coherencia con los estudios realizados en otras zonas del Caribe colombiano, en donde también se ha encontrado en bajo número de individuos (Angulo et al., 2013; González et al., 2018; Lambraño Cruz et al., 2012; A. J. Pérez-Doria et al., 2006); aunque no encontró evidencia de infección con *Leishmania* spp., estos flebotomíneos en Venezuela, presentan antecedentes de infección con parásitos del género *Leishmania* spp., pero aún así, no se les presta importancia médica (Ardila et al., 2019; Bonfante-Garrido et al., 1999; Estrada et al., 2015), por lo cual su papel podría estar desestimado.

La prevalencia de infección con *Le. infantum* en caninos de Sabanas de La Negra del 50% (2/4), es consistente con el historial epidemiológico de los caninos como reservorios, y los han catalogado como el reservorio doméstico más importante de este flagelado, tanto en áreas urbanas como rurales (Belo et al., 2013; Gavgani et al., 2002; Guhl F Restrepo M Angulo V Antunes C Campbell-Lendrum D et. Al, 2005; Organización Panamericana de la Salud, 2019b). además, es coherente con estudios previos realizados en Sucre, en municipios como Sincelejo, Ovejas y Sampués, donde encontraron prevalencias de la infección con *Leishmania* spp., con porcentajes que van desde 11.1 % al 35.7 %; en el caso puntual de Sampués, el estudio fue realizado en Escobar Arriba, un corregimiento contiguo a Sabanas de La Negra, y en el que no se discriminó la especie infectante (Paternina-gómez et al., 2013). Estas prevalencia se puede atribuir a que los caninos residentes en áreas rurales permanecen la mayor parte del tiempo en el exterior de las viviendas, principalmente durante la noche, debido al papel que cumplen como guardianes de cultivos y de otros animales domésticos (Paternina-gómez et al., 2013).

La prevalencia de infección con *Le. infantum* de 22.2% en *D. marsupialis* hallada en Sabanas de La Negra, es consistente con el papel atribuido a este pequeño mamífero, catalogado como el principal reservorio silvestre de *Le. infantum* (Organización Panamericana de la Salud, 2019b; Roque & Jansen, 2014), asimismo, es coherente con lo registrado en áreas donde la LV es endémica en Colombia en donde los porcentajes de infección con este parásito varía de 9.5% a 32%, rango en el que se encuentran los resultados aquí plasmados, provenientes del corregimiento estudiado en Sampués (Araujo Carreira et al., 2017; Quinnell et al., 2009; B. L. Travi et al., 1994; B.L. Travi et al., 1998; van der Meide et al., 2007) Además, la importancia en Colombia de *D. marsupialis* como reservorio de *Le. infantum*, radica en que este mamífero se ha encontrado con altos porcentajes de infección con este parásito; es atractivo para *Lu. evansi* (B. L. Travi et al., 1994) e infectivo para estos flebotómíneos (Adler et al., 2003); asimismo, se encuentran en abundancia en los focos de leishmaniasis visceral en el norte del país y es altamente adaptable a habitas peri-domiciliares, lo que le confiere la capacidad de movilizar al parásito de ciclos selváticos a ciclos domestico rurales o urbanos, donde están presente los vectores, representando con ello un riesgo en la trasmisión de la leishmaniasis visceral (Araujo Carreira et al., 2017; Carlos et al., 2012; Cortázar et al., 2015; Roque & Jansen, 2014; B.L. Travi et al., 1998; Bruno Travi, 2000). Se plantea que eventualmente, estas poblaciones pudieron introducir los parasitos al ambiente domiciliar, dado sus hábitos sinantrópicos y la presencia de vectores en el domicilio.

Entre los roedores capturados en Sampués, se encontró *Z. brevicauda*, con una prevalencia de infección de 33.3 % (1/3), éste es un roedor previamente registrado en el departamento de Sucre (Blanco et al., 2012; B. L. Travi et al., 1998); los reportes de *Z. brevicauda* infectados naturalmente con flagelado del género *Leishmania* son escasos y exploraciones realizadas en Colosó en el departamento de Sucre y San Andrés de Sotavento en Córdoba no lograron encontrar estos

roedores infectados con *Le. infantum*, del mismo modo, en otra exploración observaron que los flebotomíneos como *Lu. evansi*, presentaron un menor éxito de alimentación a diferencia de otros pequeños mamíferos como *D. marsupialis*, por lo que los investigadores sugirieron que es poco probable que estos roedores tengan mayor importancia en la transmisión de la LV en la región (Adler et al., 2003; B. L. Travi et al., 1998). Fuera de los límites de Colombia, ha hallado a los roedores *Z. brevicauda* infectados con otras especies de *Leishmania* como *Le. mexicana* y *Le. pifanoi* en Venezuela (Reyes & Arrivillaga, 2009). Dicho lo anterior, podemos decir que, este estudio es el primero en registrar detección molecular de *Le. infantum* en *Z. brevicauda* en el país y que estos podrían ser hospederos accidentales.

*Rattus rattus*, otro roedor encontrado en Sabana de La Negra, con una prevalencia de infección con *Le. infantum* de 12.5 % (1/8). Es un roedor sinantrópico y que se le incrimina como reservorio de *Le. braziliensis* en países de América incluyendo a Colombia (Alexander et al., 1998; Organización Panamericana de la Salud, 2019b). El hallazgo local presentado, concuerda con lo registrado en otros países suramericanos como Brasil y Venezuela, donde los porcentajes de infección varían de 0.05 – 10% (Caldart et al., 2017; Quinnell et al., 2009; Roque & Jansen, 2014; State et al., 2017; Viettri et al., 2018), de igual forma, la presencia de *Le. infantum* en *R. rattus*, también se ha registrado en países europeos como España, Italia y Portugal, donde han encontrado prevalencias de infección entre el 15.5% y 45%, lo que ha permitido sugerir que *R. rattus* podría ser un potencial reservorio de este parásito, a esto hay que agregarle que son roedores hallados en abundancia, son infectivos para vector del parásito y pueden mantener la infección en ausencia del perro (Di Bella et al., 2003; Gradon et al., 1983; Helhazar et al., 2013; Millán et al., 2014; Navea-Pérez et al., 2015). la prevalencia de infección con *Le. infantum* de 12.5% (1/8) informada en este estudio, es el primer registro en el que se identifica este patógeno en estos roedores en el

departamento de Sucre. Estos datos pueden sugerir que *R. rattus* podrían estar desempeñando un papel en la epidemiología de la LV, en la zona de estudio.

Los resultados de la prevalencia de infección con *Le. infantum* en *Bradypus variegatus* fueron del 100% (2/2), esto contrastan con los antecedentes registrados en la literatura que infección con especies del género *Leishmania* implicadas en la etiología de la LC, como: *Le. braziliensis* y *Le. panamensis*, en Costa Rica y Panamá, simultáneamente; hasta la presente no hay registros de estos perezosos infectados naturalmente con *Le. infantum*, por lo tanto, este estudio presenta por primera vez detección molecular de *Le. infantum* en *B. variegatus*, con lo cual se sugiere que estos animales podrían estar desempeñando un papel en la epidemiología de la enfermedad en la zona (Alexander et al., 1998; Lainson, 1997; Muñoz-garcía et al., 2019; Organización Mundial de la Salud, 2010; Organización Panamericana de la Salud, 2019b; Pineda et al., n.d.; Reyes & Arrivillaga, 2009).

La prevalencia de infección con *Le. infantum* en *E. asinus* del 50% (2/4), es el primer registro de detección molecular de *Le. infantum* en asnos en Colombia; este hallazgo es similar con lo encontrado en China en donde identificaron molecularmente a *Le. infantum* en *E. asinus*, con una prevalencia de 21.62% (8/37), y que motivo a los investigadores a sugerir que *E. asinus* puede ser un potencial reservorio de estos parásitos en la zona de estudio (Gao et al., 2015); Por otro lado, en la costa Caribe, se ha encontrado a *Lu. evansi*, el flebotomíneo predominante en la región, usando a *E. asinus* como fuentes de ingesta (Luís E. Paternina et al., 2016), lo que permite sugerir, que estos mamíferos podrían estar desempeñando un papel en la epidemiología de la LV en la zona de estudio.

La presencia de *Le. infantum* en bovinos, con una prevalencia de infección de 50% (2/4), es similar a recientes estudios realizados en Brasil, en donde se detectó molecularmente el material genético de *Le. infantum*, a partir de sangre periférica de estos mamíferos (Vioti et al., 2019), paralelo a ello en Brasil, también se dio a conocer, el primer aislamiento de *Le. infantum* a partir de sangre periférica de bovinos, en un área donde la leishmaniasis visceral es endémica (Paixão-Marques et al., 2019), estos hallazgos evidencian una infección parasitológicamente activa puesto que la persistencia del material genético de *Leishmania* spp. en el sistema circulatorio de un vertebrado es de aproximadamente 24 horas, y se ha sugerido que tener una PCR positiva o un hemocultivo, es un buen indicador de una infección activa o reciente (Gao et al., 2015). Con base en los resultados aquí presentados, en donde se detectó y caracterizó el parásito a partir de sangre periférica de bovinos (*B. indicus*), y se evidenció que estos mamíferos son usados con alta frecuencia como fuente de sangre por *Lu. evansi*, se sugiere que los bovinos podrían estar desempeñando un papel en la epidemiología de la LV en la zona estudio.

Finalmente hay que afirmar que la interacción entre hospederos y parásitos es compleja, multifactorial, circunstancial y dinámica, y por ello, el abordaje en el estudio de un foco debería ser lo más integral posible, ya que es necesario conocer los actores que estarían desempeñando un papel en la epidemiología de la enfermedad en un determinado lugar, como es el caso del corregimiento de Sabanas de La Negra, donde mamíferos como las zarigüeyas, roedores, bovinos, equinos y perezosos, podrían conformar una red de animales que estarían colaborando con los caninos en el mantenimiento del parásito bajo condiciones naturales, por lo tanto, sería conveniente considerar la diversidad de los determinantes, que interactúan en la epidemiología de la LV, a la hora del diseño de los programas de vigilancia y control de la enfermedad por los organismos de

Salud Pública, con el fin de tratar de minimizar el impacto negativo de esta parasitosis en la comunidad.

## CONCLUSIONES

1. *Lu. evansi* es el flebotomíneo con mayor abundancia en el foco de Leishmaniasis visceral del corregimiento Sabanas de la Negra, Sampués, con una frecuencia de 82,9 %.
2. Las horas de mayor actividad de picaduras de insectos flebotomíneos del género *Lutzomyia* se encuentra entre las 19hrs y 23hrs de la noche.
3. Los bovinos, son los animales domésticos con mayor frecuencia de uso como fuente de sangre por *Lu. evansi*.
4. *Le. infantum* se detectó molecularmente en los flebotomíneos de importancia medica presentes en la zona (*Lu. evansi*, *Lu. panamensi* y *Lu. gomezi*), y en los mamíferos domésticos, sinantrópicos y silvestres evaluados en Sabanas de La Negra.
5. En Sabanas de La Negra existe un ciclo de transmisión doméstica rural, potenciado por la presencia de vectores y reservorios domésticos y sinantrópicos.
6. El corregimiento es zona de riesgo potencial para la transmisión de leishmaniasis visceral.

## RECOMENDACIÓN

Se recomienda la evaluación de infectividad de los vertebrados que se encontraron infectados con *Le. Infantum* para flebotomíneos del género *Leishmania* presentes en la costa Caribe colombiana.

## REFERENCIAS

- Adler, G. H., Becerra, M. T., & Travi, B. L. (2003). Feeding success of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) experimentally exposed to small mammal hosts in an endemic focus of *Leishmania chagasi* in northern Colombia. *Biomedica*, 23(4), 396–400. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14968917>
- Agudelo Chivatá, N. J. (2019). Informe de evento: Leishmaniasis visceral. In *Instituto Nacional de Salud*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5614-7\\_1967](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5614-7_1967)
- Agudelo Chivatá, N. J. (2020). LEISHMANIASIS VISCERAL Periodo epidemiológico III. Colombia 2020. In *Sistema de vigilancia en salud pública (Sivigila)*. <https://doi.org/10.21897/rmvz.537>
- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., & Sereno, D. (2017). Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 57, 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
- 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>
- Alam, M. S., Ghosh, D., Khan, M. G. M., Islam, M. F., Mondal, D., Itoh, M., Islam, M. N., & Haque, R. (2011). Survey of domestic cattle for anti-*Leishmania* antibodies and *Leishmania* DNA in a visceral leishmaniasis endemic area of Bangladesh. *BMC Veterinary Research*, 7(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-27>
- Alexander, B., Lozano, C., Barker, D. C., McCann, S. H., & Adler, G. H. (1998). Detection of

- Leishmania (Viannia) braziliensis complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. *Acta Tropica*, 69(1), 41–50. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00114-9)
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Angulo, V. M., Esteban, L., Urbano, P., Hincapié, E., & Núñez, L. A. (2013). Publicación anticipada en línea. *Biomédica*, 33(4), 24. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i4.836>
- Araujo Carreira, J. C., Magalhães, M. de A. F. M., Brazil, R. P., & da Silva, A. V. M. (2017). Leishmania in Marsupials—An Overview of Infection Records in the Americas and Australia. *Open Journal of Animal Sciences*, 07(03), 315–343. <https://doi.org/10.4236/ojas.2017.73025>
- Ardila, M. M., Carrillo-bonilla, L., Pabón, A., Robledo, S. M., Biodiversidad, G., & Básicas, F. D. C. (2019). *Surveillance of phlebotomine fauna and Didelphis marsupialis (Didelphimorphia : Didelphidae) infection in an area highly endemic for visceral leishmaniasis in Colombia.* 252–264.
- Baum, M., Alcântara de Castro, E., Pinto, M. C., Marchi Goulart, T., Baura, W., Klisiowicz, D. do R., & Vieira da Costa-Ribeiro, M. C. (2015). Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. *Acta Tropica*, 143, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.11.006>
- Becerril Flores, M. A. (2011). *Parasitología médica* (Tercera). McGRAW-HILL

INTERAMERICANA EDITORES. <https://doi.org/10.1071/MU10063>

- Bejarano, E. E., & Estrada, L. G. (2016). Family psychodidae. *Zootaxa*, 4122(1), 187–238. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4122.1.20>
- Bejarano, E. E., Pérez-doria, A., Paternina-Gómez, M., & Martínez, L. (2012). Natural infection of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) with *Leishmanias* (*Viannia*) spp. in northern Colombia. *Am J Trop Med Hyg*, 87(January), 173.
- Bejarano, E. E., Uribe, S., Rojas, W., & Vélez, I. D. (2002). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the City of Sincelejo, Colombia. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(5), 645–647. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000500010>
- Belo, V. S., Werneck, G. L., Barbosa, D. S., Simões, T. C., Nascimento, B. W. L., da Silva, E. S., & Struchiner, C. J. (2013). Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002182>
- Blanco, P. T., Corrales, H. A., Arroyo, S. M., Pérez, J. J., Álvarez, L. G., Castellar, A. M., Bióloga, M. A., Blanco, P. T., Corrales, H. A., Arroyo, S. M., Pérez, J. J., Álvarez, L. G., & Castellar, A. M. (2012). Comunidad de roedores en el municipio de San Marcos, Sucre, Colombia. *Revista Colombiana Ciencia.*, 4(1), 89–101.
- Bonfante-Garrido, R., Urdaneta, R., Urdaneta, I., Alvarado, J., & Perdomo, R. (1999). Natural Infection of *Lutzomyia rangelifera* (Psychodidae) with *Leishmania* in Barquisimeto, Lara State, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94(October 1998), 11–12.
- Caldart, E. T., Freire, R. L., Ferreira, F. P., Ruffolo, B. B., Sbeghen, M. R., Mareze, M., Garcia, J. L., Mitsuka-Breganó, R., & Navarro, I. T. (2017). *Leishmania* in synanthropic rodents (

- Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Braz. J. Vet. Parasitol*, 29, 17–27.
- Camargo, M. E. (1966). Fluorescent Antibody Test for the Serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical Modification Employing Preserved Culture Forms of *Trypanosoma Cruzi* in a Slide Test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 8(5), 227–235.
- Canchila Muñoz, L., & Contreras Gomez, M. J. (2016). Prevalencia de anticuerpos frente a *Leishmania* spp. en roedores sinantrópicos de un foco mixto de leishmaniasis en el área urbana del municipio de Ovejas, Colombia [Universidad de Sucre]. In *Repositorio Universidad de Sucre*. <https://doi.org/10.1145/3132847.3132886>
- Carlos, J., Carreira, A., Valéria, A., & Pereira, D. D. P. (2012). *Natural infection of Marsupialia ) with Didelphis aurita (Mammalia : Leishmania infantum in Brazil*. 2–6.
- Carrascal Mercado, J. E. (2019). *Código de barras de ADN para la Identificación de las fuentes de ingesta vegetal de las especies del género Lutzomyia (Diptera, Psychodidae) presentes en un ambiente urbano con transmisión domiciliar de Leishmania spp. en el municipio de Ovejas-Sucre (Tes. Universidad de Sucre*.
- Castillo Arroyo, P. L. (2011). *Validación de las trampas CDC con Diodos Emisores de Luz (LED) en la captura de insectos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae)*. Universidad De Sucre.
- Cerqueira, E. J. L., Sherlock, I., Gusmão, A., Barbosa, A. de A., & Nakatani, M. (2003). Experimental infection of *Equus asinus* with *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(6), 695–701.
- Chena, L., Nara, E., Canese, A., Oddone, R., & Russomando, G. (2013). Aplicación de la PCR para la detección de género y complejos de *Leishmania* en diferentes tipos de muestras biológicas. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, 11(1), 45–

- Christensen, H. A., Fairchild, G. B., Herrer, A., Johnson, C. M., Young, D. G., & Vasquez, A. M. De. (1983). The ecology of cutaneous leishmaniasis in the republic of Panama. *Journal of Medical Entomology*, 20(5), 463–484. <https://doi.org/10.1603/033.046.0208>
- Cochero, S., & Blanco, P. (2001). Determinación de la fauna flebotomínea en un foco de leishmaniasis en el municipio de Sampués (Sucre). In *Resúmenes, XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, Cartagena de Indias, Colombia*.
- Cochero, Suljey, Anaya, Y., Díaz, Y., Paternina, M., Luna, A., Paternina, L., & Bejarano, E. E. (2007). Natural infection of *Lutzomyia cayennensis cayennensis* with trypanosomatid parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Los Montes de María, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59(1), 35–39.
- Cortázar, T. M., Hernández, J., Echeverry, M. C., Camacho, M., Aguilar, E., Díaz, N. L., Sánchez, M. a, Esteve, L. O., Saz, S. V., Hosein, S., Solano-Gallego, L., Melo, G. D., Silva, J. E. S., Grano, F. G., Souza, M. S., Machado, G. F., Mir, F., Fontaine, E., Reyes-Gomez, E., ... Kliwer, S. A. (2015). Cytokines Pattern in Liver and Spleen of Dogs with Natural Visceral Leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, 289(3–4), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.002>.
- Cortés Alemán, L., Pérez-Doria, A., & Bejarano Martínez, E. E. (2009). Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) antropofílicos de importancia en salud pública en Los Montes de María, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(3), 220–225.
- Cortés, L. A., & Fernández, J. J. (2008). Especies de *Lutzomyia* en un foco urbano de leishmaniasis visceral y cutánea en El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. *Biomedica*, 28, 433–440. <https://doi.org/S0120-41572008000300013> [pii]

- Di Bella, C., Vitale, F., Russo, G., Greco, A., Milazzo, C., Aloise, G., Cagnin, M., C. D. B., Vitale, F., Russo, G., Greco, A., Milazzo, C., Aloise, G., & Cagnin, M. (2003). Are rodents a potential reservoir for *Leishmania infantum* in Italy? *J. Mt. Ecol.*, *7*, 125–129. [https://www.researchgate.net/publication/284150453\\_Are\\_rodents\\_a\\_potential\\_reservoir\\_for\\_Leishmania\\_infantum\\_in\\_Italy](https://www.researchgate.net/publication/284150453_Are_rodents_a_potential_reservoir_for_Leishmania_infantum_in_Italy)
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2016). *InfoStat* (No. 2016). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Estrada, L. G., Aponte, O. A., & Bejarano, E. E. (2015). Registros nuevos de especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en el departamento de Cesar, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, *20*(3), 225–228. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n3.48853>
- Feliciangeli, M. D. (2006). Sobre Los Flebótomos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), Con Especial Referencia a Las Especies Conocidas En Venezuela on the Phlebotomine Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) With Special Reference To the Species Known in Venezuela. *Acta Biol. Venez.*, *26*(2), 61–80.
- Feliciangeli, M. D., Rodriguez, N., De Guglielmo, Z., & Rodriguez, A. (1999). The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II. Vectors and parasites. *Parasite*, *6*(2), 113–120. <https://doi.org/10.1051/parasite/1999062113>
- Ferreira, E. D. C., Cruz, I., Cañavate, C., Melo, L. A. De, Antônia, A., Pereira, S., Madeira, F. A. M., Alves, S., Valério, N., Cunha, H. M., Paglia, A. P., & Ferreira Gontijo, M. C. (2015). Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. *BMC Veterinary Research*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0392-y>
- Ferro, C., Torres, M., Tesh, R. B., Wilson, M. L., Morrison, A. C., & Pardo, R. (2015). Nocturnal

- Activity Patterns of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis in Colombia. *Journal of Medical Entomology*, 32(5), 605–617. <https://doi.org/10.1093/jmedent/32.5.605>
- Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J.-C., & Van der Auwera, G. (2010). Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2), 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007>
- Gao, C. H., Wang, J. Y., Zhang, S., Yang, Y. T., & Wang, Y. (2015). Survey of wild and domestic mammals for infection with *leishmania infantum* following an outbreak of desert zoonotic visceral leishmaniasis in Jiashi, People's Republic of China. *PLoS ONE*, 10(7), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132493>
- Gavgani, A., Mohite, H., Edrissian, G., Mohebbali, M., & Davies, C. (2002). Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67, 1–6.
- Gharbi, M., Mhadhbi, M., Rejeb, A., Jaouadi, K., Rouatbi, M., & Darghouth, M. A. (2015). Leishmaniosis ( *Leishmania infantum* infection ) in dogs. *Revue Scientifique et Technique*, 34(2), 613–626.
- González, C., León, C., Paz, A., López, M., Molina, G., Toro, D., Ortiz, M., Cordovez, J. M., Atencia, M. C., Aguilera, G., & Tovar, C. (2018). Diversity patterns, *Leishmania* DNA detection, and bloodmeal identification of Phlebotominae sand flies in villages in northern Colombia. *PLoS ONE*, 13(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190686>
- Gradon, L., Pozio, E., Gramiccia, M., Maroli, M., & Bettini, S. (1983). Leishmaniasis in Tuscany ( Italy ): VII . Studies on the role of the black rat, *Rattus rattus* , in the epidemiology of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77, 427–

431.

- Guhl F Restrepo M Angulo V Antunes C Campbell-Lendrum D et. Al. (2005). Entomológica Y Control De La. *TRENDS in Parasitology*, 21, 259–262.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3 . 0. *SYSTEMATIC BIOLOGY*, 59, 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Gutiérrez, R., Muñoz, G., Ferro, C., Sandoval, C. M., & Angulo, V. M. (2014). Especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) posibles vectores de leishmaniasis en la ciudad de Bucaramanga, Santander, Colombia. *Biomédica*, 18(2), 161. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v18i2.985>
- Han, S., Wu, W., Chen, K., Osman, I., Kiyim, K., Zhao, J., Hou, Y., Wang, Y., Wang, L., & Zheng, C. (2018). Epidemiological survey of sheep as potential hosts for *Leishmania* in China. *BMC Veterinary Research*, 1–8.
- Haouas, N., Pesson, B., Boudabous, R., Dedet, J. P., Babba, H., & Ravel, C. (2007). Development of a molecular tool for the identification of leishmania reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(6), 1054–1059. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.1054>
- Helhazar, M., Leitão, J., Duarte, A., Tavares, L., & Pereira, I. (2013). Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra – Portugal. *Parasites & Vectors*, 1–6.
- Herrera, G., Higuera, A., Patiño, L. H., Ayala, M. S., & Ramírez, J. D. (2018). Description of *Leishmania* species among dogs and humans in Colombian Visceral Leishmaniasis

- outbreaks. *Infection, Genetics and Evolution*, 64, 135–138.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.023>
- Holdridge, L. R. (1967). Life zone ecology. In *Tropical science center* (Vol. 2).  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.1999.00329.x>
- Hoyos, R., Vivero, R., Contreras, M., Uribe, S., & Torres, C. (2009). Composición y Abundancia de *Lutzomyia* spp . ( Diptera : Psychodidae ) asociadas a diferentes hábitats agropecuarios de Santa Fe de Antioquia. *Biomédica*, 29, 300–301.
- Instituto Nacional de Salud. (2016). Boletín epidemiológico semanal, número 32 de 2016. In *Boletín epidemiológico semanal* (pp. 1–32). <https://doi.org/10.33610/23576189.2019.32>
- Instituto Nacional de Salud. (2017). *Informe de evento leishmaniasis, Colombia, 2017* (p. 19).
- Instituto Nacional de Salud. (2018a). *Informe de evento leishmaniasis, Colombia, semestre I de 2018*.
- Instituto Nacional de Salud. (2018b). *Leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral. Colombia 2018* (pp. 1–28).
- Instituto Nacional de Salud. (2020). *Mapa de incidencias por eventos*. Portal WEB SIVIGILA.  
[http://portalsivigila.ins.gov.co/sivigila/incidencias/pages/map\\_general.php](http://portalsivigila.ins.gov.co/sivigila/incidencias/pages/map_general.php)
- Jiménez, D. C. (2015). Parasitosis: Leishmaniasis. *Revista Medica De Costa Rica Y Centroamerica*, 72(614), 129–133.
- Karimi, A., Alborzi, A., & Amanati, A. (2016). Visceral Leishmaniasis: An Update and Literature Review. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*, 4(3).  
<https://doi.org/10.5812/pedinfect.31612>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). *MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7 : Improvements in Performance and Usability Article Fast Track*. 30(4), 772–780.

<https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-havas, S., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). *Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data*. 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

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), 336–342. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.336>

Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J. P., & Bastien, P. (2002). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 40(1), 210–215. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.210>

Lainson, R. (1997). On *Leishmania enriettii* and Other Enigmatic *Leishmania* Species of the Neotropics. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 92(3), 377–387.

Lambraño Cruz, L. F., Manjarrez Pinzón, G., & Bejarano Martínez, E. E. (2012). Variación temporal de especies de *Lutzomyia* (Diptera : Psychodidae) en el área urbana de Sincelejo (Colombia) Temporal variation of *Lutzomyia* sand flies (Diptera : Psychodidae) in the urban area of Sincelejo (Colombia). *Salud Uninorte*, 28(16), 191–200.

Leblois, R., Kuhls, K., François, O., Schönian, G., & Wirth, T. (2011). Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 1091–1095. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.004>

Lobsiger, L., Müller, N., Schweizer, T., Frey, C. F., Wiederkehr, D., Zumkehr, B., & Gottstein, B.

- (2010). An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Veterinary Parasitology*, 169(3–4), 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.022>
- Martínez, D., Ávila, J., & Molano, F. (2018). Actividad nocturna de *Nyssomyia yuilli* (Young & Porter, 1972) y *Nyssomyia trapidoi* (Farchild & Hertig, 1952) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) en el municipio de Otanche (Boyacá, Colombia), zona endémica de leishmaniasis cutánea. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, 50(2), 106–114. <https://doi.org/10.18273/revsal.v50n2-2018002>
- Martínez, L. (2018). *Frecuencia de uso de animales domésticos como fuente de alimentación de Lutzomyia spp. (Diptera: Psychodidae) en la vereda Toro, San Cayetano, Bolívar (Tesis de pregrado)*. [Universidad de Sucre]. <https://repositorio.unisucre.edu.co/bitstream/001/624/1/T616.9364007 M385.pdf>
- Martínez, L. P., Rebollo, J. A., Luna, A. L., Cochero, S., & Bejarano, E. E. (2010). Molecular identification of the parasites causing cutaneous leishmaniasis on the Caribbean coast of Colombia. *Parasitology Research*, 106(3), 647–652. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1712-6>
- Millán, J., Ferroglia, E., & Solano-Gallego, L. (2014). Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitology Research*, 113(6), 2005–2014. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3929-2>
- Mills, J. N., Childs, J. E., Ksiazek, T. G., Peters, C. J., & Velleca, W. M. (1995). *Methods for Trapping and Sampling Small Mammals for Virologic Testing* (pp. 10–11).
- Ministerio de la Protección Social, ., & Instituto Nacional de Salud, . (2013). Guía protocolo para la vigilancia en salud pública de leishmaniasis. *Pro-R02.003000-016*, 1–27. <http://www.idsn.gov.co/index.php/subdireccion-de-salud-publica/42-enfermedades->

transmitidas-por-vectores/649-guia-protocolo-para-la-vigilancia-en-salud-publica-de-leishmaniasis

Ministerio de Salud y Protección Social. (2018). Lineamientos para la atención clínica integral de leishmaniasis en Colombia. In *Minsalud* (Issue 32).

Montoya-Lerma, J., Cadena, H., Oviedo, M., Ready, P. D., Barazarte, R., Travi, B. L., & Lane, R. P. (2003). Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Tropica*, 85(1), 19–29. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(02\)00189-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(02)00189-4)

Montoya-Lerma, James, & Ferro, C. (1999). Flebótomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. *Insectos de Colombia*, 2, 211–245.

Muñoz-garcía, C., Sánchez-montes, S., Villanueva-garcía, C., Romero-callejas, E., Díaz-lópez, H. M., Gordillo-chávez, E. J., Martínez-carrasco, C., Berriatua, E., & Rendón-franco, E. (2019). The role of sloths and anteaters as *Leishmania* spp . reservoirs : a review and a newly described natural infection of *Leishmania mexicana* in the northern anteater. *Parasitology Research*, 1–7.

Muskus, C. E., & Villa, M. M. (2002). Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. In *Biomédica* (Vol. 22, Issue 2, pp. 167–177). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i2.1156>

Nardoni, S., Altomonte, I., Salari, F., Martini, M., & Mancianti, F. (2019). Serological and molecular findings of leishmania infection in healthy donkeys (*Equus asinus*) from a canine leishmaniosis endemic focus in tuscany, italy: A preliminary report. *Pathogens*, 8(3), 1–7. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030099>

Navea-Pérez, H. M., Díaz-Sáez, V., Corpas-López, V., Merino-Espinosa, G., Martín-Sánchez, F.,

- & Morillas-Márquez, J. (2015). *Leishmania infantum* in wild rodents : reservoirs or just irrelevant incidental hosts? *Parasitol Res*, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4434-y>
- Nieves, E., & Rondon, M. (2007). *Sobrevivencia del parásito Leishmania en el insecto vector: interacciones moleculares*. 27, 66–72.
- OMS. (2017). *Leishmaniasis. Nota descriptiva N°375*. Web Page OMS. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- Organización Mundial de la Salud. (2010). Control de las Leishmaniasis. In *Serie de Informes Técnicos*.
- Organización Panamericana de la Salud. (2015). *Protocolos para la Vigilancia y Control de Roedores Sinantrópicos* (p. 103). <https://iris.paho.org/handle/10665.2/50507>
- Organización Panamericana de la Salud. (2018). *Manual de diagnóstico y tratamiento de las Leishmaniasis*. [www.paho.org](http://www.paho.org)
- Organización Panamericana de la Salud. (2019a). *Informe Epidemiológico de las Américas. Leishmaniasis (marzo, 2019)*. <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505>
- Organización Panamericana de la Salud. (2019b). *Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas*. 183. [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50524/9789275320631\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50524/9789275320631_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Paixão-Marques, M. dos S., Alves-Martin, M. F., Guiraldi, L. M., dos Santos, W. J., de Lemos, F. A., Sánchez, G. P., Richini-Pereira, V. B., & Lucheis, S. B. (2019). First isolation of *Leishmania infantum* by blood culture in bovines from endemic area for canine visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 1–3. <https://doi.org/10.1017/s0031182019000088>
- Paternina-gómez, M., Díaz-olmos, Y., Paternina, L. E., & Bejarano, E. E. (2013). Alta prevalencia

de infección por leishmania (kinetoplastidae: Trypanosomatidae) en perros del norte de colombia. *Biomédica*, 33(3), 375–382. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i3.780>

Paternina, Luis E., Pérez-Doria, A., Paternina, L. E., Paternina-Gómez, M., & Martínez, L. (2012). Natural infection of *Lutzomyia evansi* (Diptera : Psychodidae ) with *Leishmania* ( Viannia ) spp . in northern Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, January 2016, 173.

Paternina, Luís E., Verbel-Vergara, D., Romero-Ricardo, L., Pérez-Doria, A., Paternina-Gómez, M., Martínez, L., & Bejarano, E. E. (2016). Evidence for anthropophily in five species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification of bloodmeals. *Acta Tropica*, 153, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.005>

Paternina Tuiran, L. E. (2012). *Determinacion molecular de las fuentes alimenticias de Lutzomyia spp. (Diptera: Psychodidae) asociadas a casos de Leishmaniasis Cutanea en el departamento de Sucre, Caribe Colombiano (Tesis de Maestría)* [Universidad Nacional de Colombia]. <http://www.bdigital.unal.edu.co/6896/> Acceso en línea

Paternina Tuirán, L. E., Díaz-Olmos, Y. A., Paternina-Gómez, M., Carrillo-Bonilla, L. M., Vélez, I. D., & Bejarano, E. E. (2016). Detección de anticuerpos anti-*Leishmania* (Trypanosomatidae) en poblaciones caninas del departamento de Sucre, Colombia. *Colombia. Acta Biol. Colomb*, 21(1), 183–188. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n1.48845>

Paternina Tuirán, L. E., Díaz-Olmos, Y. A., Paternina-Gómez, M., Carrillo-Bonilla, L. M., Vélez, I. D., & Bejarano Martínez, E. E. (2015). DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-*Leishmania* (Trypanosomatidae) EN POBLACIONES CANINAS DEL DEPARTAMENTO

- DE SUCRE, COLOMBIA. *Acta Biológica Colombiana*, 21(1), 183–188.  
<https://doi.org/10.15446/abc.v21n1.48845>
- Pérez-Doria, A., Hernández-Oviedo, E., & Bejarano, E. E. (2008). *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) de la Reserva Serranía de Coraza y Montes de María, Colombia. In *Revista Colombiana de Entomología* (Vol. 34, Issue 1, pp. 98–101).
- Pérez-Doria, A. J., Bejarano, E. E., & Blanco-Tuirán, P. J. (2006). Presencia de *Lutzomyia dubitans* (Sherlock, 1962) en la ciudad de Sincelejo, departamento de Sucre, Colombia. Presencia de *Lutzomyia dubitans* (Sherlock, 1962) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) en la Ciudad de Sincelejo, Departamento de Sucre. *Boln. Asoc. Esp. Ent.*, 30(January), 207–210.
- Pineda, C. M., Moreno, R., & Moreno, S. (n.d.). *Especies Silvestres de Perezosos en Colombia. Ministerio De Ambiente, Vivienda Y Desarrollo Territorial.*
- Ponte-sucré, A. (2007). *Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimio-resistencia en Leishmania. January 2016.*
- Psaroulaki, A., Antoniou, M., Toumazos, P., & Mazeris, A. (2015). Rats as Indicators of the Presence and Dispersal of Pathogens in Cyprus: Ectoparasites, Parasitic Helminths, Enteric Bacteria, and Encephalomyocarditis Virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Rats as indicators of the. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(11), 733–739. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.08.005>
- Quinnell, R. J., Courtenay, O., Rose, W., Quinnell, R. J., Courtenay, O., Quinnell, R. J., & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136(14), 1915–1934.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182009991156>

- Ramírez, J. D., Hernández, C., León, C. M., Ayala, M. S., Flórez, C., & González, C. (2016). Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Scientific Reports*, 6(March), 28266. <https://doi.org/10.1038/srep28266>
- Reale, S., Maxia, L., Vitale, F., Glorioso, N. S., Caracappa, S., Zooprofilattico, I., & Della, S. (1999). *Detection of Leishmania infantum in Dogs by PCR with Lymph Node Aspirates and Blood*. 37(9), 2931–2935.
- Reyes, A., & Arrivillaga, J. (2009). Fauna Mammalia asociada a los focos de leishmaniasis neotropical: Situación en Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 49(1), 35–52.
- Ríos Yuil, J. M., & Sousa, O. (2010). Inmunología en la infección por Leishmania. Conceptos actuales. *Rev. Med. Cient.*, 23(1), 19–31. [http://www.revistamedicocientifica.org/index.php/rmc/article/viewFile/232/pdf\\_5%0A](http://www.revistamedicocientifica.org/index.php/rmc/article/viewFile/232/pdf_5%0A)
- Rivero Rodríguez, M. E., Rodríguez Jiménez, J. L., Pérez-Doria, A. J., & Bejarano Martínez, E. E. (2018). Aislamiento de *Leishmania infantum* a partir de *Canis familiaris* en área urbana del Caribe colombiano. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(3), 923. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i3.13708>
- Rodgers, M. R., Popper, S. J., & Wirth, D. F. (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, 71(3), 267–275. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90031-7)
- Rodrigues, F. T., Pereira, C., Dubey, J. P., Nóvoa, M., Quaresma, M., Schallig, H., Cardoso, L., & Lopes, A. P. (2019). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* spp. in domestic donkeys from Portugal. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 28(1), 172–176.

<https://doi.org/10.1590/s1984-296120180091>

- Romero, L., Lastre, N., Pérez-Doria, A., & Bejarano, E. (2013). *Lutzomyia abbonenci* y *Lutzomyia olmeca bicolor* (DIPTERA: PSYCHODIDAE), NUEVOS REGISTROS PARA EL DEPARTAMENTO DE SUCRE, COLOMBIA. *Acta Biologica Colombiana*, 18(2), 375–380.
- Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>
- Said, B., A-leishmania, M., Rachid, B., & Leishmaniose, a. (2001). Visceral Leishmaniasis: Wild Animal Hosts. *Tropical Medicine*, 96(1990), 630–631. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12625138>
- Salgado-Almario, J., Ovalle-Bracho, C., Hernández, C. A., & Ovalle-Bracho, C. (2019). Geographical distribution of *Leishmania* species in Colombia, 1985-2017. *Biomédica*, 39(2), 1–31. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4312>
- Salomón, O. D. (2009). Vectores de leishmaniasis en las Américas. *Gazeta Médica Da Bahia.*, 79, 3–15.
- Sánchez-Saldaña, L., Sáenz-Anduaga, E., Pancorbo-mendoza, J., Zegarra-del-carpio, R., Garcés-Velasco, N., Regis-roggero, A., Sanchez-Saldaña, L., Saenz-Alduaga, Eliana, Pancorbo-mendoza, J., Zegarra-del-carpio, R., Regis-roggero, A., Sánchez-Saldaña, L., Sáenz-Anduaga, E., Pancorbo-mendoza, J., Zegarra-del-carpio, R., Garcés-Velasco, N., & Regis-roggero, A. (2004). Leishmaniasis. *Dermatologia Peruana*, 14(2), 82–98.
- Sandoval, C. M., Gutiérrez, R., Cárdenas, R., & Ferro, C. (2014). 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(1), 217. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1515>
- Santamaría, E., Ponce, N., Zipa, Y., & Ferro, C. (2006). Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania* ( *Viannia* ) panamensis en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá , piedemonte del valle del Magdalena medio , Colombia. *Biomedica*, 26, 82–94.
- Santander, C., Flórez, M., Martínez, J. P., Gutiérrez, R., Luna, K. P., Serrano, V. H., Ferro, C., Angulo, V. M., & Sandoval, C. M. (2006). *Lutzomyia longipalpis* ( Diptera : Psychodidae ) en un foco suburbano de leishmaniosis visceral en el Cañón del Chicamocha en Santander, Colombia. *Biomédica*, 26(1), 109–120.
- Schonian, G., Mauricio, I., & Cupolillo, E. (2009). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in Parasitology*, 26(10), 466–469. <https://doi.org/10.1136/bmj.c1350>.
- Sereno, D. (2019). *Leishmania* ( *Mundinia* ) spp .: from description to emergence as new human and animal *Leishmania* pathogens. *New Microbes and New Infections*, 30, 100540. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100540>
- Singh, N., Mishra, J., Singh, R., & Singh, S. (2013). Animal Reservoirs of Visceral Leishmaniasis in India. *Journal of Parasitology*, 99(1), 64–67. <https://doi.org/10.1645/ge-3085.1>
- State, G., Pereira, S., Ferreira, E. D. C., Viana, A. C., Andrade-filho, D., Paz, G. F., & Paglia, P. (2017). Detection of *Leishmania* spp in silvatic mammals and isolation of *Leishmania* ( *Viannia* ) braziliensis from *Rattus rattus* in an endemic area for leishmaniasis in Minas. *PLoS ONE*, 1–9.
- Tovar A, C., & Yasnot A, M. (2017). Leishmaniasis visceral en América Latina y perspectivas terapéuticas. *Revista MVZ Córdoba*, 22(supl), 6075. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1077>
- Travi, B. L., Jaramillo, C., Montoya, J., Segura, I., Zea, A., Goncalves, A., & Velez, I. D. (1994).

- Didelphis marsupialis, an important reservoir of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi and Leishmania (Leishmania) chagasi in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50(5), 557–565. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.557>
- Travi, B. L., Osorio, Y., Becerra, M. T., & Adler, G. H. (1998). Dynamics of Leishmania chagasi infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(3), 275–278. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(98\)91009-4](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(98)91009-4)
- Travi, B.L., Osorio, Y., Guarín, N., & Cadena, H. (1998). Leishmania(Leishmania)chagasi:Clinical and Parasitological Observations in Experimentally InfectedDidelphis marsupialis, Reservoir of New World Visceral Leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 88(1), 73–75. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4214>
- Travi, BL, Vélez, I., Brutus, L., Segura, I., Jaramillo, C., & Montoya, J. (1990). Lutzomyia evansi, an alternate vector of Leishmania chagasi in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. In *Trans R Soc Trop Med Hyg* (Vol. 84, Issue 5). <https://doi.org/10.1159/000464976>
- Travi, Bruno. (2000). Leishmaniasis visceral canina. *MVZ*, 5(1), 29–32. <https://doi.org/10.21897/rmvz.537>
- Travi, Bruno L., Adler, G. H., Lozano, M., Cadena, H., & Montoya-Lerma, J. (2002). Impact of Habitat Degradation on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of Tropical Dry Forests in Northern Colombia. *Journal of Medical Entomology*, 39(3), 451–456. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.3.451>
- Travi, Bruno L., Montoya, J., Jaramillo, C., Llano, R., Velez, I. D., & Gallego, J. (1996). Bionomics of Lutzomyia evansi (Diptera: Psychodidae) Vector of Visceral Leishmaniasis in Northern Colombia. *Journal of Medical Entomology*, 33(3), 278–285.

<https://doi.org/10.1093/jmedent/33.3.278>

- Travi, Bruno L, Montoya, J., Gallego, J., Jaramillo, C., Llano, R., & Velez, I. D. (1996). Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera : Psychodidae) Vector of Visceral Leishmaniasis in Northern Colombia. *Entomological Society of America*, 278–285.
- van der Meide, W. F., Schoone, G. J., da Silva, E. S., Schallig, H. D. F. H., & Gontijo, C. M. F. (2007). *Didelphis marsupialis* (Common Opossum): A Potential Reservoir Host for Zoonotic Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil) . *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7(3), 387–393. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0651>
- Vásquez-Trujillo, A., Santamaría-Herreño, Erika González-Reina, A. E., Buitrago-Álvarez, L. S., Góngora-Orjuela, A., & Cabrera-Quintero, O. L. (2008). *Lutzomyia antunesi*, Probable Vector de Leishmaniasis Cutánea en el Área Rural de Villavicencio. 10(4), 625–632.
- Víctor Acero, P., Perla Ángel, B., Esther Fonseca, B., Ferrer, L., & Roura, X. (2015). Canine Leishmaniosis: Tools for diagnosis in veterinary practice in Colombia. *Revista MVZ Cordoba*, 20(3), 4822–4842.
- Vietri, M., Herrera, L., Aguilar, C. M., Morocoima, A., Reyes, J., Lares, M., Lozano-arias, D., García-alzate, R., & Chacón, T. (2018). Veterinary Parasitology : Regional Studies and Reports Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi* / *Leishmania* spp . coinfection in domestic , peridomestic and wild mammals of Venezuelan co-endemic areas. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 14(January), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.10.002>
- Vioti, G., Franco Leonel, J. A., Lemes, K. M., Figueredo Pereira, V., Lage Ferreira, H., Borges Keid, L., Hoffman Madureira, E., Soares, R. M., Benassi, J. C., & Oliveira, T. M. F. de S. (2019). Molecular detection of *Leishmania* spp . in cattle from Brazil by means of PCR using

- internal transcribed spacer 1. *Braz. J. Vet. Parasitol*, 28(june), 303–305.
- Werneck, G. L. (2016). *Control de la leishmaniasis visceral en Brasil : ¿fin de un ciclo?* (Vol. 32, Issue 6). <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00ED010616>
- 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)* (Issue 1). [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(95\)90687-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(95)90687-8)
- Zambrano-Hernandez, P., Ayala-Sotelo, M. S., Fuya-Oviedo, P., Montenegro-Puentes, C. A., Aya-Vanegas, N. M., Aguilera-Jaramillo, G., Blázquez, O., Becerra, S., Lozano, C., Rojas-García, M. C., & Rodríguez-Toro, G. (2015). Brote urbano de leishmaniasis visceral en Neiva, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 17(4), 514–527. <https://doi.org/10.15446/rsap.v17n4.44663>
- Zambrano, P., & Mercado, M. (2014). Leishmaniasis. *Protocolo de Vigilancia En Salud Pública - INS*, 1–29.
- Zambrano, Pilar. (2014). Protocolo de Vigilancia en Salud Pública de Leishmaniasis. In *Instituto Nacional de Salud*. <http://www.clinicamedihelp.com/documentos/protocolos/PRO Leishmaniasis.pdf>

## ANEXOS

### ANEXO 01. CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### TOMA DE MUESTRA

FECHA		
DD	MM	AAAA

PERRO	CABALLO	
VACA	BURRO	

#### Identificación del Animal:

Nombre:		No. de muestra:	
Dirección:	Barrio/vereda:	Municipio:	

Apariencia del Animal	Sano		Enfermo	
-----------------------	------	--	---------	--

#### Síntomas Generales

Apatía		Adelgazamiento		Atrofia muscular	
Visceromegalia		Diarrea		Sangrado	
Curvatura de las uñas		Alopecia		Alteraciones oculares	

Lesiones Cutáneas	NO		SI		NÚMERO	
Ubicación de lesiones:						

Yo, \_\_\_\_\_ propietario del canino, acepto y autorizo para que sean tomadas las muestras necesarias para el estudio, sabiendo que dicho procedimiento no representa ningún riesgo para la salud o vida del animal

---

**FIRMA**

**ANEXO 02.** Tabla de comparación de métodos basados en ADN, con otros métodos no basados en ADN en la detección, identificación, discriminación y cuantificación de especies de *Leishmania* (Akhoundi et al., 2017)

odología	Detección de <i>Leishmania</i> en muestra clínica ¥	Identificación de <i>Leishmania</i>	Discriminación de <i>Leishmania</i> #¤					Cuantificación de <i>Leishmania</i>	Necesidad de Cultivo	Sensibilidad	Especificidad	Costo	Referencias		
			G	S	SG	C	S								
Método basado en ADN	PCR METHODS*	SI	SI	+	+	+	+	+	SI	NO	XXX	XX	MEDIO	Noyes et al., 1998	
	RAPD	NO	NO						NO	SI			MEDIO	Tibayrenc et al., 1993	
	AFLP	NO	NO						NO	NO	XX	XXX	MEDIO	Kumar et al., 2010	
	SNP	NO	NO	+	+	+	+	+	NO	NO	XXX	XXX	MEDIO	Downing et al., 2012	
	MLMT	NO	NO						NO	SI	XXX	XXX	MEDIO	Kuhls et al., 2007	
	MLST	NO	NO	+	+	+	+	+	NO	SI	XXX	XXX	MEDIO	Ravel et al., 2006	
	OC-PCR	SI	SI	+	+	+	+	+	NO	NO	XXX	XX	MEDIO	Basiye et al., 2010	
	PCR-ELISA	SI	SI	+	+	+	+	+	NO	NO	XX	XXX	MEDIO	De Doncker et al., 2005	
	PCR-HRM	SI	SI	+	+	+	+	+	NO	NO	XX	XXX	MEDIO	Nasereddin and Jaffe 2010	
	PCR-RFLP	SI	SI	+	+	+	+	+	NO	NO	XX	XXX	MEDIO	Dweik et al., 2007	
	Secuenciación de genes	SI	SI	+	+	+	+	+	NO	NO	XXX	XXX	MEDIO	Van Eys et al., 1992	
	Métodos no basados en PCR	PFGE	NO	SI					+	NO	SI	XX	XX	MEDIO	Beverley, 1988
		NASBA	NO	SI						NO	NO	XX	XXX	MEDIO	Basiye et al., 2010
		LAMP	NO	SI						NO	NO	XXX	XXX	MEDIO	Ghasemian et al., 2014
	Métodos no basados en ADN	Examen microscópico	SI	NO	+					SI	NO	XX	X	BAJO	Bensoussan et al., 2006
Cultivo de parásito In vitro		SI	NO	+					NO	SI	X	X	MEDIO	Castilla et al., 1995	
Aislamiento en Animales experimentales		SI	NO	+					NO	NO	X	XX	MEDIO	Gupta, 2011; Loria-Cervera and Andrade-Narvaez, 2014	
Pruebas de diagnóstico dérmico		SI	NO	+					NO	NO	XX	XXX	BAJO	Sadeghian et al., 2013	
Xenodiagnóstico		SI	NO	+					NO	NO	XX	XXX	MEDIO	Sadlova et al., 2015	
ELISA		SI	NO	+					NO	NO	XX	XX	MEDIO	Sundar and Rai 2002	
Métodos serológicos**		IFAT	SI	SI	+					NO	NO	XXX	XX	MEDIO	Figueiredo et al., 2010
	ICT	SI	SI	+					NO	NO	XX	XX	MEDIO	da Silva et al., 2015	

	DAT	SI	NO	+					NO	NO	XX	XXX	MEDIO	Adams et al., 2012
	CIE	SI	NO	+					NO	NO	X	XX	MEDIO	Mancianti & Meciani, 1988
	Western blot	SI	SI	+	+	+	+	+	NO	NO	XXX	XXX	MEDIO	Gonçalves et al., 2002
Métodos basados en proteínas	MLEE	NO	SI	+	+	+	+	+	NO	SI			MEDIO	Rioux et al., 1990
	MALDI-TOF	NO	SI	+	+	+	+	+	NO	SI			COSTOSO	Lixia et al., 2012

**Nota.** El asterisco (\*) indica que incluye diferentes métodos de PCR, por ejemplo, PCR multiplex y anidada. \*\*: basado en la detección de anticuerpos o antígenos de especies de *Leishmania*. Detección de *Leishmania* ¥: capacidad para detectar el parásito *Leishmania* a nivel de género. Número de identificación de *Leishmania*: la identificación de *Leishmania* se refiere a la capacidad de identificar una especie de *Leishmania*, mientras que la discriminación se refiere a la capacidad de identificar a todos o varios *Leishmania* especies sin "a priori". X: los grados de sensibilidad y especificidad están dados por (X); X: bajo, XX: medio, XXX: alto. ¢: Niveles de discriminación manejables; G: Género, S: Sección, SG: Subgénero, C: Complejo, S: Especie (Akhoundi et al., 2017).

**Abreviaturas:** RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar); AFLP (polimorfismo en la longitud del fragmento amplificado); SNP (polimorfismo de un solo nucleótido); MLMT (tipificación multilocus de microsatélites); MLST (tipificación de secuencia multilocus); OC-PCR (Oligocromatografía-PCR); PCR-ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas); PCR-HRM (fusión de alta resolución); PCR-RFLP (polimorfismo de longitud de fragmento de restricción); PFGE (electroforesis en gel de campo pulsado); NASBA (amplificación basada en secuencia de ácido nucleico); LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle); ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas); IFAT (prueba de inmunofluorescencia indirecta); TIC (tecnología de inmunocromatografía); DAT (prueba de aglutinación directa); CIE (contrainmunolectroforesis); MLEE (electroforesis de enzimas multilocus); MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo).

**ANEXO 03. Tabla de características de los blancos genéticos utilizados para la detección del género *Leishmania* y su aplicabilidad para la discriminación dentro del género y la cuantificación de parásitos.**

ADN DIANA	DNA LOCUS	Número de copias	Conservación de genes	Detección	Identificación	Nivel de discriminación*				Cuantificación**
		Simple/Múltiple	Conservado/Variable			S	SG	C	S	
ADN RIBOSOMAL (rADN)	18S	M	C	SI	NO					SI
	5.8S	M	C	SI	NO					NO
	28S (24Sa)	M	C	SI	NO					NO
	28S (24Sb)	M	C	SI	NO					NO
	28S (E)	M	C	SI	NO					SI
	28S (Y)	M	C	SI	NO					NO
	28S (Z)	M	C	SI	NO					NO
	28S (δ)	M	C	SI	NO					NO
	5S	M	C	SI	NO					NO
	ITS1	M	C	SI	SI	+	+	+	+	SI
	ITS2	M	C	SI	SI	+	+	+	+	NO
	IGS	M	C	SI	NO					NO
	Mini-exon (Spliced Leader)	M	C/V	SI	SI	+	+	+	+	SI
	ETS	M	C	SI	NO					NO
	NTS	M	C	SI	NO					NO
ADN CROMOSÓMICO	MSP or gp63	M	C	SI	SI	+	+	+	+	NO
	hsp20, 23, 70	S	C	SI	SI	+	+	+	+	NO
	cpb	M	C	SI	SI	+	+	+	+	SI
	HASPB	S	C	SI	NO					NO
	POLA	S	C	SI	SI	+	+	+	+	NO
	NAGT	S	C	SI	SI	+	+	+	+	NO
	SHERP	S	C	SI	NO					NO
	MAP kinase	S	C	SI	NO					NO
	A2	S (CL)/M (VL)	C	SI	SI	+	+	+	+	NO
	GENES CODIFICANTES DE PROTEÍNAS									

			EF	S	C	SI	SI	+	+	+	+	NO
			MIF	S	C	SI	NO					NO
			G6PD	S	C	SI	SI	+	+	+	+	SI
			6PGDH	S	C	SI	SI	+	+	+	+	NO
			Histone	M	C	SI	NO					NO
			Tubulin	M	C	SI	NO					SI
			MPI	S	C	SI	SI	+	+	+	+	NO
			LPG	S	V	SI	NO					NO
			RPOIIS	S	C	SI	SI	+	+	+	+	NO
			12S	M	SI	SI	NO					NO
			9S	M	SI	SI	NO					NO
			COI, COII, COIII	M	SI	SI	SI	+	+	+	+	NO
			MURF1, MURF2, MURF4, MURF5	M	SI	SI	NO					NO
			ND1, ND3, ND4, ND7, ND8, ND9	M	C	SI	NO					NO
		Maxicirculo	CYT B	M	C	SI	SI	+	+	+	+	SI
			RPS12	M	C	SI	NO					NO
			G3, G4	M	C	SI	NO					NO
			DR maxicircle	M	V	SI	NO					NO
			gRNA maxicircle	M	C	SI	NO					NO
			IG maxicircle	M	C	SI	NO					NO
			CSB-1, CSB-2, CSB-3	M	C	SI	SI	+	+	+	+	SI
		Minicirculos	Variable region	M	V	SI	SI					SI
			gRNA minicircle	M	V	SI	NO					NO

M: Múltiple, S: Simple C: Conservado, V: Variable, \*: Diferentes niveles de discriminación; S: Sección, SG: Subgénero, C: Complejo, S: Especie. \*\*: Se basa en los resultados publicados en la literatura (Akhoundi et al., 2017).