PAPEL DE LOS ECTOPARÁSITOS (Acari: Ixodida) COMO TRANSMISORES DE LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA EN COLOMBIA

YIRYS ARLETH DÍAZ OLMOS
MARGARET PATERNINA GÓMEZ
LUIS ENRIQUE PATERNINA TUIRÁN

M.Sc. EDUAR ELÍAS BEJARANO MARTÍNEZ
Director

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA
SINCELEJO- SUCRE
2008

PAPEL DE LOS ECTOPARÁSITOS (Acari: Ixodida) COMO TRANSMISORES DE LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA EN COLOMBIA

YIRYS ARLETH DÍAZ OLMOS
MARGARET PATERNINA GÓMEZ
LUIS ENRIQUE PATERNINA TUIRÁN

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo con Énfasis en Biotecnología

M.Sc. EDUAR ELÍAS BEJARANO MARTÍNEZ
Director

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA
SINCELEJO- SUCRE
2008

Este logro esta dedicado a mi familia, en especial a mis padres Luís Paternina Arroyo y Emilce Tuirán Martínez, fuente de mis debilidades y fortalezas, por su apoyo incondicional.

A la memoria de nuestro amigo Leimar Murillo, siempre lo llevamos presente.

A la memoria de mi abuelo José Tuirán, a quien le debo la persona que actualmente soy, a pesar del corto tiempo que compartimos.

Luís Enrique Paternina Tuirán

A mis padres y hermanos, por
hacer que cada día sea
más fácil de vivir.

Margaret

A Dios, sin duda Él hace todo posible y mis sueños realidad.

A mamá, mujer trabajadora, sé que este triunfo y el de mis hermanos han sido muchos años de trabajo para ti.

A papá y hermanos, personas que junto a mamá me motivan al logro de mis sueños, sueños en los cuales ellos son pieza indispensable.

A mi gran amor Lisandro, contigo las situaciones son más fáciles de llevar. Gracias por alimentar mis ganas de pensar en grande. Este es el comienzo de un futuro juntos lleno de bendiciones.

A mis inolvidables amigos, gracias por hacer de esta parte del camino un espacio lleno de gratos y valiosos momentos para recordar.

A Margaret y Lucho, un buen equipo de trabajo, con quienes compartí el duro pero incomparable camino de hacer ciencia, todo este tiempo juntos los convirtió en personas muy importantes para mi.

A mi tutor Eduar Elías Bejarano, por su apoyo en todo momento y por la confianza que depositó en nosotros, la cual nos dio seguridad y nos hizo creer en nuestras capacidades.

A mis profesores, Pedro Blanco, Eduardo Hernández, Adolfo Consuegra, Santiago Ruiz y junto con ellos todas aquellas personas que me brindaron su sabiduría y experiencia.

Yirys Díaz

AGRADECIMIENTOS

A Dios

A nuestros padres

A Eduar Elías Bejarano

A Suljey Cochero

A Pedro Blanco

A los compañeros del Grupo de Investigaciones Biomédicas

A Juan Manuel Díaz Soto, Eduardo Hernández, Rafael Ortega

A la Universidad de Sucre

A la DIUS

Al PECET

A los habitantes de Sabanas del Potrero, Escobar Arriba y El Campín

NOTA DE ACEPTACIÓN

_____

_____

_____

_____

_____

Primer Jurado

_____

Segundo Jurado

_____

Tercer Jurado

CIUDAD Y FECHA:_____

Únicamente los autores son los responsables de las ideas expuestas en este trabajo (Artículo 12, Resolución 02-03)

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE IMÁGENES ..... **XII**
LISTA DE FIGURAS ..... **XIII**
LISTA DE TABLAS ..... **XIV**
LISTA DE ANEXOS ..... **XV**
RESUMEN ..... **XVI**
ABSTRACT ..... **XVII**
INTRODUCCIÓN **18**
2. OBJETIVOS **20**
2.1 Objetivo General 20
2.2 Objetivos Específicos 20
3. ESTADO DEL ARTE **21**
3.1 LEISHMANIASIS VISCERAL 22
3.1.1 DISTRIBUCIÓN 22
3.1.2 AGENTE ETIOLÓGICO 24
Clasificación Taxonómica 24
Biología 25
Ciclo de vida 26
Transmisión del parásito 28
3.1.3 VECTORES 28
3.1.4 RESERVORIOS 29
3.1.5 EL PERRO COMO RESERVORIO DE *L. infantum* 30
Signos Clínicos 31
Respuesta Inmunológica 32
Diagnóstico 33
3.2 LAS GARRAPATAS 34
Taxonomía 35

Biología 36
Morfología 37
Enfermedades transmitidas por garrapatas 38
Las garrapatas como vectores de *Leishmania*.....39
4. METODOLOGÍA 41
4.1 ÁREA DE ESTUDIO 41
4.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....41
Búsqueda de caninos infectados con *Leishmania* 41
Obtención de muestras de sangre 42
Colecta de garrapatas.....43
4.3 DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LAS GARRAPATAS.....43
4.4 OBTENCIÓN DE SUERO.....44
4.5 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) 44
4.6 INFECCIÓN NATURAL DE CANINOS Y SUS GARRAPATAS CON *Leishmania* 45
4.6.1 EXTRACCIÓN DE ADN 45
Extracción de ADN a partir de sangre de caninos 45
Extracción de ADN a partir de garrapatas 46
4.6.2 DETECCIÓN DE ADN DE *Leishmania* EN SANGRE DE CANINOS Y EN GARRAPATAS MEDIANTE PCR.....47
Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....48
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....48
5. RESULTADOS.....49
5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO 49
5.2 SEROPREVALENCIA DE LA LEISHMANIASIS CANINA POR IFI 51
5.3 INFECCIÓN NATURAL DE CANINOS CON *Leishmania* POR PCR.....52
5.4 ESPECIES DE GARRAPATAS ASOCIADAS A LA POBLACIÓN CANINA 55
5.5 INFECCIÓN NATURAL DE GARRAPATAS CON *Leishmania* POR PCR58
6. DISCUSIÓN.....59

7. CONCLUSIONES.....65
8. RECOMENDACIONES 66
9. REFERENCIAS.....67
ANEXOS 80

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Leishmaniasis visceral.....22
Imagen 2. Morfología de *Leishmania*. 26
Imagen 3. Reservorios silvestres de *L. infantum*.....30
Imagen 4. Signos clínicos en leishmaniasis canina.....32
Imagen 5. Perros de las localidades bajo estudio infectados con *Leishmania* spp.. 50
Imagen 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. 52
Imagen 7. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR. 53
Imagen 8. Garrapatas de la familia Ixodidae encontradas en el departamento de Sucre.....56
Imagen 9. Caracteres morfológicos de *Ornithodoros puertoricensis*.....57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la leishmaniasis visceral. 23
Figura 2. Distribución de la leishmaniasis visceral en Colombia. 23
Figura 3. Ciclo de vida de *L. infantum*. 27
Figura 4. Taxonomía actual de las garrapatas de la familia Ixodidae. 35
Figura 5. Morfología de Ixodidae.....37
Figura 6. Morfología de Argasidae. 38
Figura 7. Ubicación geográfica de los municipios del departamento de Sucre en los que se realizó búsqueda activa de caninos.....42
Figura 8. Estructura del operón ribosomal de *L. donovani* mostrando la secuencia blanco de los cebadores SSU561F/R. 47
Figura 9. Distribución de la población canina bajo estudio según el sexo. 49
Figura 10. Distribución de los perros estudiados según la edad. 50
Figura 11. Títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* detectados mediante IFI en la población canina de cada localidad.....51
Figura 12. Análisis de los fragmentos amplificados por PCR usando los cebadores SSU561F/R.....54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores y condiciones del cóctel de reacción para PCR. 47
Tabla 2. Perfil térmico del protocolo de amplificación con los cebadores SSU561F/R. 48
Tabla 3. Diagnóstico comparativo de *Leishmania* en muestras de sangre de perros. 54
Tabla 4. Número total de individuos por especie de garrapatas recolectados.....55
Tabla 5. Estimaciones morfométricas de los especímenes de *O. puertoricensis*. 58

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Encuesta epidemiológica: ectoparásitos de caninos y la leishmaniasis visceral. 81

Anexo B. Información detallada de los caninos estudiados y resultados de las técnicas de diagnóstico realizadas..... 83

RESUMEN

En Colombia, la leishmaniasis visceral canina es una enfermedad endémica en los departamentos de Huila, Tolima, Cundinamarca, Santander, Bolívar, Córdoba y Sucre. *Lutzomyia evansi* y *Lutzomyia longipalpis* son los vectores de *Leishmania infantum,* agente etiológico de esta enfermedad. Sin embargo, las bajas tasas de infección natural que exhiben estos insectos, la alta prevalencia de leishmaniasis visceral en caninos de zonas endémicas y la infección natural de *Rhipicephalus sanguineus* con parásitos del género *Leishmania* en otros países, sugieren la potencial participación de las garrapatas como vectores alternos de *L. infantum*. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar el papel de las garrapatas que infestan caninos de focos endémicos para la leishmaniasis visceral en el departamento de Sucre como vectores de *Leishmania* spp.

En las localidades de Sabanas del Potrero, Escobar Arriba y El Campín, se detectaron altas prevalencias para la leishmaniasis visceral en la población canina mediante PCR e IFI, alcanzando valores del 35.7% y 72%, respectivamente, siendo estas las prevalencias más altas diagnosticadas para esta enfermedad en el país. De los 134 perros examinados, el 37.3% presentaron garrapatas, las cuales fueron identificadas como *R. sanguineus*, *R. (Boophilus) microplus* y *Amblyomma ovale* pertenecientes a la familia Ixodidae, y *Ornithodoros (Alectorobius) puertoricensis* de la familia Argasidae. A pesar de la infección natural de los caninos de las zonas de estudio con *Leishmania*, ninguna de las garrapatas examinadas presentó infección por estos parásitos. Se concluye que estos ectoparásitos no están involucrados en el ciclo de transmisión de *L. infantum* en el departamento de Sucre y se confirma la importancia del perro como principal reservorio doméstico del parásito.

ABSTRACT

In Colombia, the canine visceral leishmaniasis is an endemic disease in Huila, Tolima, Cundinamarca, Santander, Bolívar, Córdoba and Sucre departments. *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis* are the vectors of *Leishmania infantum,* etiologic agent of this disease. However, the low rates of natural infection in sand flies, the high prevalence of visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas, and the natural infection of *Rhipicephalus sanguineus* with *Leishmania* parasites in other countries, suggest the potential participation of ticks as alternative vectors of *L. infantum.* The aim of this investigation was evaluate the role of ticks that infest dogs from endemic focus for visceral leishmaniasis in the Sucre department as vectors of *Leishmania* spp.

In the Sabanas del Potrero, Escobar Arriba and El Campín localities, high prevalence for visceral leishmaniasis was diagnosed in the canine population using PCR and IFI technique, reaching values of 35.7% and 72%, respectively. The last are the highest values of *Leishmania* infection found in the country. Of 134 dogs examined, 37.3% had ticks, identified as *R. sanguineus*, *R. (Boophilus) microplus* and *Amblyomma ovale* belonging to the Ixodidae family, and *Ornithodoros (Alectorobius) puertoricensis* that belong to the Argasidae family. Despite of the dogs from the studied areas had natural infection with *Leishmania*, no one of tested ticks shown infection by these parasites. We concluded that these ectoparasites are not involved in the cycle of transmission of *L. infantum* at the Sucre department. Additionally, is confirmed the relevance of the dog as primary domestic reservoir of *Leishmania*.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis visceral es una importante enfermedad zoonótica transmitida por insectos flebotomíneos, ampliamente distribuida en regiones tropicales y neotropicales del mundo, ocasionando anualmente 57000 muertes (1). Esta enfermedad crónica y frecuentemente letal afecta principalmente a niños menores de 10 años, personas inmunocomprometidas y perros susceptibles (2,3).

La leishmaniasis visceral es causada por parásitos protozoos del complejo *Leishmania donovani* (Orden: Kinetoplastida). Los agentes etiológicos son *L. donovani* en el Viejo Mundo, y *L. infantum* en el Viejo Mundo y las Américas (4). En América Latina el perro es considerado el principal reservorio de *L. infantum*, reportando seroprevalencias de 24% (5), 36% (6), y más del 67% en áreas de alta endemicidad (5).

En Colombia, los focos de leishmaniasis visceral se encuentran distribuidos a lo largo de la cuenca del río Magdalena y sus afluentes en los departamentos de Huila, Tolima, Cundinamarca, Santander, Bolívar, Córdoba y Sucre. En el 2007 se registraron 54 casos de la enfermedad, la mayoría de los cuales se presentaron en Bolívar, Córdoba y Sucre, departamentos que constituyen el foco endémico tradicional de la región Montes de María, siendo Sucre el tercer departamento que aporta más casos de esta enfermedad en el país (7,8).

Aunque la transmisión de *L. infantum* al reservorio ocurre por la picadura de su vector natural *Lu. longipalpis* y *Lu. evansi*, estudios realizados indican que las tasas de infección de estos insectos son muy bajas, en Colombia oscilan entre el

0.5 y 0.9% (9-12), en Venezuela no superan el 0.28% (12) y en Brasil fluctúan entre 0.2 y 0.5% (13,14). Este factor y la existencia de un mayor índice de infección en perros que en humanos (15), además de la presencia de brotes de leishmaniasis canina en ausencia de flebotomíneos (16-18) indican la posible presencia de mecanismos alternativos de transmisión de la enfermedad entre los reservorios.

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos y podrían estar implicados en el mantenimiento de *L. infantum* entre los reservorios domésticos principalmente debido a la alta prevalencia con la que estos artrópodos se hallan sobre los perros reservorios (19), a la infección natural con *Leishmania* reportada en estos ectoparásitos (19,20), a su presencia en la mayoría de las áreas donde la leishmaniasis visceral canina es endémica, a su mecanismo de alimentación que las coloca como excelentes vectores mecánicos (21) y a la necesidad de tres hospederos para llevar a cabo su ciclo biológico aumentando la posibilidad de que la garrapata transporte parásitos de perros infectados a perros sanos.

El hallazgo de parasitismo por garrapatas identificadas como *R. sanguineus* en humanos (22) en concordancia con la posible participación de ésta en la epidemiología de la leishmaniasis visceral canina hace necesario el desarrollo de investigaciones dirigidas a aclarar el estatus vectorial de estos artrópodos dada la estrecha proximidad de los perros reservorios con el entorno humano y al potencial riesgo del surgimiento de nuevos focos de leishmaniasis por desplazamiento a áreas no endémicas de especímenes caninos infectados, que favorecerían la distribución de la enfermedad. De esta forma, se optaría por nuevas medidas de control enfocadas hacia estos potenciales vectores de enfermedades con el fin de evitar una mayor incidencia de la leishmaniasis en el departamento de Sucre, una región considerada de alto riesgo para contraer la enfermedad.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Establecer el papel de las garrapatas como potenciales transmisores de leishmaniasis visceral canina en focos endémicos del departamento de Sucre.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar la fauna de garrapatas que parasitan a los perros encontrados en el área de estudio.
- Determinar la infección natural de las garrapatas de caninos con parásitos del género *Leishmania.*
- Determinar la seroprevalencia de leishmaniasis en poblaciones caninas mediante inmunofluorescencia indirecta.
- Establecer la prevalencia de leishmaniasis en los caninos encontrados mediante reacción en cadena de la polimerasa.

3. ESTADO DEL ARTE

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades causadas por la infección con parásitos protozoos del género *Leishmania*. Es endémica en 88 países de regiones tropicales y subtropicales de Asia, África, Europa y América, afecta a 14 millones de personas en el mundo, con 1.5 a 2 millones de nuevos casos cada año, y se estima que 368 millones de personas están expuestas a riesgo de infección con leishmaniasis (23,24).

Se considera que al menos 20 especies de *Leishmania* causan enfermedad en animales y el hombre. La enfermedad se presenta en tres formas clínicas, cutánea, mucocutánea y visceral, dependiendo de la compleja interacción entre las características de virulencia de la especie infectante y la respuesta inmune de su hospedero (3).

La leishmaniasis cutánea típicamente resulta de la infección con especies dermatrópicas de los complejos *Leishmania major* y *Leishmania tropica* en el Viejo Mundo, y por *Leishmania mexicana* y *Leishmania braziliensis* en América (25). Las manifestaciones clínicas varían de una lesión ulcerativa localizada a lesiones múltiples nodulares no ulcerativas (3).

La leishmaniasis mucocutánea también llamada “espundia”, se manifiesta por la destrucción severa de las membranas nasofaríngeas. Esta forma de la enfermedad es propia de América Central y del Sur, sus agentes etiológicos son *L. braziliensis, L. panamensis y L. peruviana* (24, 26).

3.1 LEISHMANIASIS VISCERAL

La leishmaniasis visceral es una de las enfermedades transmitidas por vectores más importantes en el mundo con 500.000 nuevos casos y 57.000 muertes cada año (1). Las manifestaciones clínicas comprenden fiebre, pérdida de peso, anemia y una marcada hepatoesplenomegalia que causa mal función en el hígado, bazo y médula ósea (Imagen 1). La leishmaniasis visceral es comúnmente causada por especies del complejo *Leishmania donovani*, el cual incluye a *L. donovani* y *L. infantum* (3,27).

Imagen 1. Leishmaniasis visceral. Tomado de: Canine Leishmaniasis: an update. Proceedings of the Internacional Canine Leishmaniasis Forum, 1999.

3.1.1 DISTRIBUCIÓN

La leishmaniasis visceral se encuentra ampliamente distribuida, con el 90% de los casos ocurriendo en áreas rurales de Bangladesh, India, Nepal, Sudán y Brasil, afectando principalmente a niños menores de 10 años (24).

Figura 1. Distribución de la leishmaniasis visceral. Tomado de: Nature Reviews Microbiology, 2004. 2: 692-693.

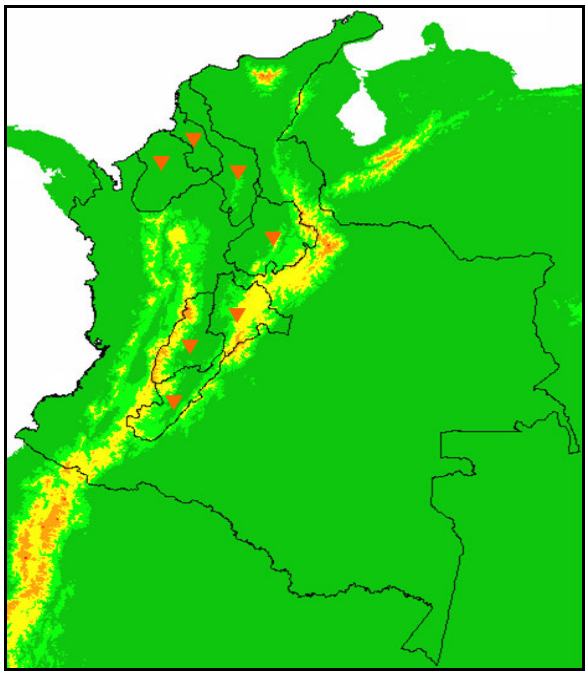

Figura 2. Distribución de la leishmaniasis visceral en Colombia. Los triángulos naranjas indican los departamentos afectados por la enfermedad.

En América la leishmaniasis visceral es causada por *L. infantum*, extendiéndose desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina (26) (Figura1). La leishmaniasis visceral en Colombia, se conoce desde 1944 cuando Gast-Galvis describió el primer caso en el departamento de Santander (28). Posteriormente se han informado nuevos focos de la enfermedad encontrándose actualmente distribuida en las zonas de bosque muy seco y seco tropical en la región del Valle del Río Magdalena en los departamentos de Santander, Cundinamarca, Tolima y Huila, y en la región de la Costa Atlántica en los departamentos de Guajira, Córdoba, Sucre y Bolívar (28,29), siendo estos tres últimos los departamentos que históricamente constituyen el foco de leishmaniasis visceral más importante del país aportando alrededor del 85% de los casos cada año (7) (Figura 2).

3.1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

Clasificación Taxonómica

Leishmania infantum es un protozoo flagelado que pertenece al Reino de los Protistas, su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: PROTISTA Haeckel, 1866

Subreino: PROTOZOA Goldfuss, 1817

Filo: SARCOMASTIGOPHORA Honigberg–Balamuth, 1963

Subfilo: MASTIGOPHORA Deising, 1866

Clase: ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909

Orden: KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963

Suborden: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880

Familia: TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901

Género: *Leishmania* Ross, 1903

Especie: *Leishmania infantum* Nicolle, 1908

Revisado por Levine *et al*, 1980 y Whittaker RH, 1969.

El género *Leishmania* ha sido dividido en dos subgéneros, *Viannia* y *Leishmania*, basado en el sitio de desarrollo del promastigote en el flebotomíneo vector. Las especies del subgénero *Viannia*, todas del Nuevo Mundo, se desarrollan en el intestino posterior del vector antes de migrar al intestino medio y anterior (peripilaria), mientras que el subgénero *Leishmania* incluye las especies que se desarrollan en el intestino medio y posterior del vector (suprapilaria). Dentro de este último subgénero se encuentra *L. infantum*, agente etiológico de la leishmaniasis visceral zoonótica (24).

Biología

Morfológicamente *L. infantum* es similar a las otras especies del género *Leishmania*, sin embargo existen diferencias en el comportamiento biológico, inmunológico, tipo de enfermedad que producen y distribución geográfica.

En el interior de los macrófagos del hospedero vertebrado *Leishmania* se presenta en forma de amastigote, tiene una forma ovalada o redondeada, inmóvil, midiendo entre 2 a 3μ de diámetro. El núcleo es central y cerca está el kinetoplasto, una estructura mitocondrial especializada que contiene ADN extracelular (ADNk); asociado al kinetoplasto está un flagelo rudimentario o rizoplasto que no se extiende fuera del parásito. Los amastigotes están adaptados a la temperatura corporal y al medio ácido de los fagolisosomas de los macrófagos donde ellos residen (Imagen 2A). En el tubo digestivo de la hembra del hospedero

invertebrado, el parásito se presenta en forma de promastigote, extracelular, alargado, de aproximadamente 20µ de longitud. Tiene un núcleo central y un kinetoplasto terminal o subterminal, y en la parte anterior del parásito se origina un flagelo, casi de igual tamaño del cuerpo (Imagen 2B) (30).

L. infantum tiene un genoma de 35.5 megabases (3.55 x 10^7 nucleótidos) con 36 cromosomas entre 0.35 a 3 megabases que equivalen a más del 80% del ADN total. El ADNk representa hasta el 20% de todo el ADN del parásito y está formado por una red gigante de moléculas circulares, 50 maxicírculos de 30 a 40 kilobases y de unos 10.000 a 20.000 minicírculos que poseen una secuencia variable en el 80% de los nucleótidos y unos 120 pares de bases conservados (24).

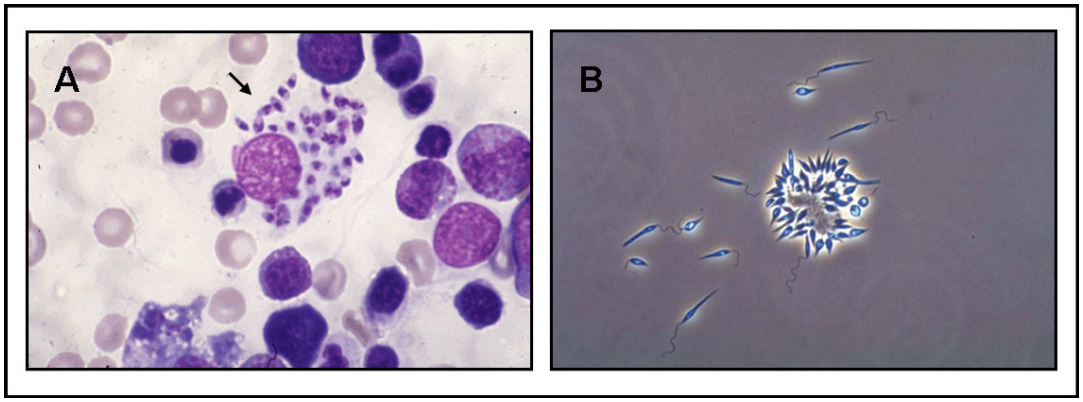

Imagen 2. Morfología de *Leishmania*: **A.** Amastigotes en el interior de un macrófago. **B.** Promastigotes de *Leishmania*. Tomado de: www.pasteur.ac_ir-researchDepartment-molecular Immunology-images-cara_jpg.htm.

Ciclo de vida

Leishmania infantum es un parásito digénico que realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedero invertebrado en forma flagelada o promastigote

y en el vertebrado, dentro de las células del sistema reticuloendotelial, en forma aflagelada o amastigote.

El ciclo de vida inicia cuando la hembra flebotomínea infectada pica al hombre u otros hospederos vertebrados e introduce el parásito en su forma promastigote, el cual alcanza rápidamente las células dendríticas o los macrófagos dentro de los que encuentra las condiciones adecuadas para su desarrollo. Una vez en el interior del fagocito, el parásito pasa de promastigote a amastigote e inicia un proceso de división por fisión binaria. En otros casos permanecen en reposo hasta tanto algunas de la células parasitadas migran hacia el torrente circulatorio y a través de él llegan hasta el bazo, hígado, médula ósea y órganos linfoides secundarios comprometiendo entonces a otros macrófagos y células dendríticas. Al alcanzar un cierto número de parásitos en el interior de las vacuolas fagocíticas ocurre la lisis de la célula hospedera y salen al exterior los amastigotes para invadir nuevas células.

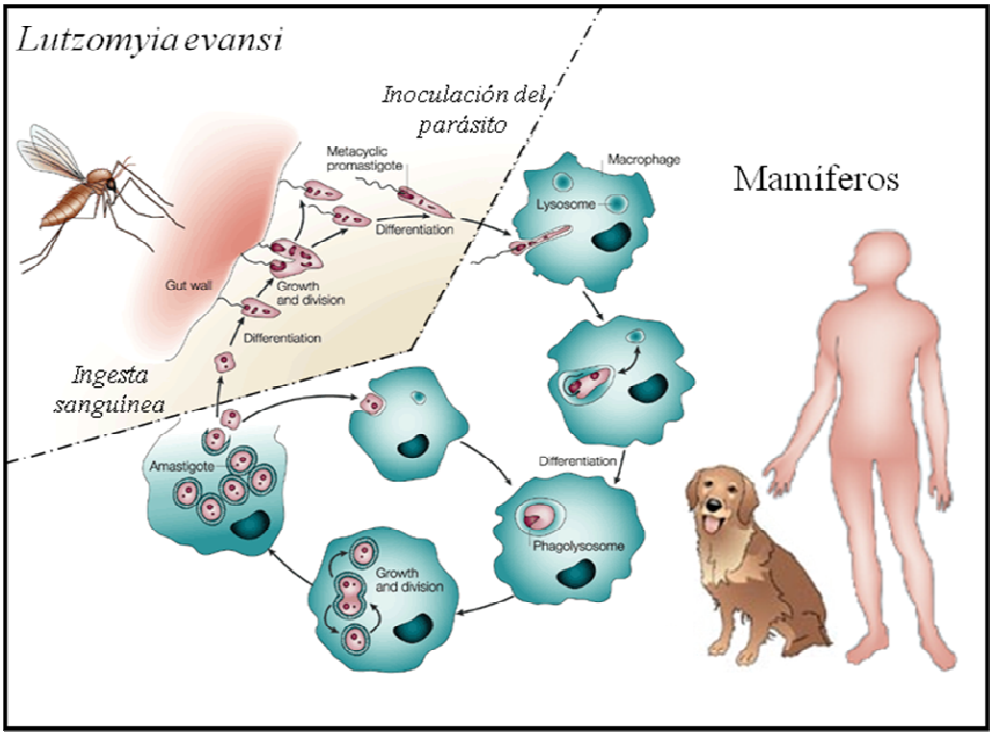

Figura 3. Ciclo de vida de *L. infantum*

Cuando un flebotomíneo hembra ingiere, mediante la picadura, sangre con amastigotes de un animal infectado, estos se transforman en promastigotes en el intestino medio del flebotomíneo. Posteriormente, migran hacia la faringe y probóscide del insecto, pudiendo ser inoculados durante otra picadura a un nuevo vertebrado sano (31) (Figura 3).

Transmisión del parásito

Las leishmaniasis pueden ser zoonosis si el reservorio es animal, o antroponosis si es humano, la mayoría de las leishmaniasis pertenecen al primer grupo incluyendo la forma visceral causada por *L. infantum.*

En la leishmaniasis zoonótica el humano se infecta sólo de manera esporádica ya que estas infecciones se mantienen de forma natural en focos de infección cuyos límites están definidos por la distribución y densidad de los hospederos y las especies vectoras. Sin embargo, la penetración del hombre en la selva y medio rural, y la urbanización no planificada con viviendas próximas a áreas de transmisión activa han llevado a un incremento global de las zonas endémicas para esta enfermedad. Sumado a ello, los cambios medioambientales han favorecido la aparición de nuevos reservorios e insectos involucrados en la transmisión de *L. infantum* en zonas habitadas por el hombre, aumentándose así el riesgo de infección para éste (24,32).

3.1.3 VECTORES

Actualmente se reconoce que los vectores naturales de *Leishmania* son dípteros pertenecientes a la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae, género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en América. Morfológicamente

Lutzomyia es un insecto de 3-5mm de longitud que en estado de reposo pliegan sus grandes alas en forma de V, poseen un cuerpo cubierto de cerdas y tienen patas largas. Solo las hembras son hematófagas y son capaces de transmitir parásitos del género *Leishmania* a través de su picadura (33).

En Colombia los flebotomíneos están distribuidos a lo largo del territorio nacional, siendo *Lu. longipalpis* el principal vector de *L. infantum* (34). Sin embargo, en la Costa Norte de Colombia este papel es asumido por *Lu. evansi* (10), flebomíneo ampliamente distribuido en la región, hallándose tanto en zonas rurales como en áreas urbanas (35,36). Las tasas de infección natural de este flebotomíneo en el departamento de Sucre son del 1.6% (37), mientras que en regiones endémicas para la enfermedad en Córdoba estas tasas son mucho más bajas, no superando el 0.1% (28). A pesar de ello, estas regiones registran el mayor número de casos para la enfermedad en humanos a nivel nacional.

3.1.4 RESERVORIOS

Los principales hospederos mamíferos de *L. infantum* son miembros de la familia Canidae, siendo implicados como reservorios silvestres del parásito los zorros *Cerdocyon thous* (38,39) y *Lycalopex vetulus* (40) en América Latina, el zorro rojo *Vulpes vulpes* en Europa Occidental y el chacal dorado *Canis aureus* y *V. vulpes* en el Medio Oriente (41). Así mismo, algunos miembros de la familia Didelphidae como las zarigüeyas *Didelphis albiventris* y *D. marsupiales* han sido también sugeridas como reservorios selváticos. En Colombia, *D. marsupialis* ha sido considerado un importante reservorio con tasas de infección de hasta el 32.4%. Debido a su dieta omnívora y a su comportamiento sinantrópico que unen los ciclos de transmisión natural de este parásito con las actividades humanas, estos animales son asumidos como reservorios ideales de *L. infantum* (28,29,42,43).

El papel del gato como reservorio de *L. infantum* es aún controversial y se ha considerado como un hospedero secundario de infección más que como un hospedero accidental (44).

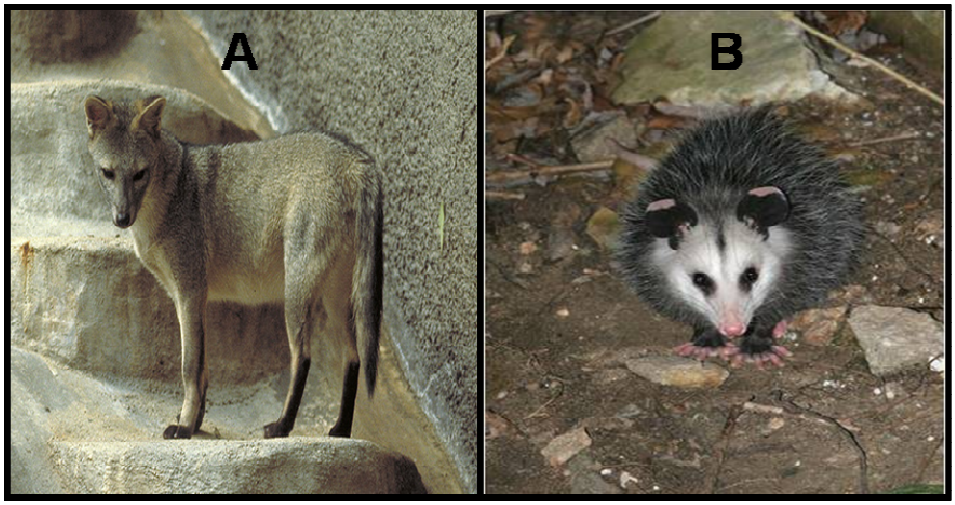

Imagen 3. Reservorios silvestres de *L. infantum*: **A.** *Cerdocyon thous* y **B.** *Didelphis marsupialis*. Tomado de: www.flickr.com y www.scienceviews.com.

3.1.5 EL PERRO COMO RESERVORIO DE *L. infantum*

El perro, *Canis familiaris*, es el principal reservorio de *L. infantum* en el ciclo de transmisión doméstico. Fuerte evidencia de ello son su facilidad para transmitir *L. infantum* al insecto vector debido a su intenso parasitismo cutáneo (44), las altas tasas de infección natural superiores a la infección humana, y la abundancia y cercanía al hombre, lo que favorece el mantenimiento del ciclo doméstico de transmisión del parásito (39,45,46).

En Colombia, los perros de áreas endémicas reúnen las características antes mencionadas, necesarias para el establecimiento de estos como el principal reservorio del parásito en el ciclo doméstico de transmisión. En focos endémicos

de la Costa Caribe colombiana en donde se presenta anualmente el mayor número de casos de leishmaniasis visceral humana, ha sido reportada una alta prevalencia de la enfermedad en caninos con tasas del 3.8 al 36% empleando IFI, del 8.3 al 26.1% por examen parasitológico directo y del 10 al 17.24% por PCR (28,47,48,49). Sin embargo, la enfermedad también presenta alta endemicidad en los departamentos de Huila y Tolima con seroprevalencias entre el 5.2 y el 28.1% (49,50).

Signos Clínicos

L. infantum produce en el perro una enfermedad debilitante de curso crónico. Los signos clínicos de leishmaniasis canina varían ampliamente como consecuencia de los numerosos mecanismos patogénicos en el proceso de la enfermedad y la diversidad de la respuesta inmune en el hospedero, presentándose de forma concomitante signos cutáneos y viscerales. Sin embargo, la mayoría de los perros son naturalmente resistentes a la enfermedad y parecen clínicamente normales o asintomáticos, a pesar de estar infectados. En áreas endémicas solo el 10% de perros infectados desarrollan enfermedad clínica evidente (51). Los signos clínicos más comunes son lesiones cutáneas (alopecia, dermatitis, úlceras cutáneas, onicogrifosis), alteraciones oculares (conjuntivitis, blefaritis, uveítis) y afecciones viscerales (fiebre, linfoadenopatía local o generalizada, pérdida de peso, emaciación, anemia, glomerulonefritis, falla renal y diarrea) (Imagen 4) (51, 52).

De acuerdo a la ausencia o presencia de signos clínicos de la enfermedad, los perros infectados con *L. infantum* se clasifican como: sintomáticos, aquellos presentando más de tres signos clínicos; oligosintomáticos, de uno a tres signos clínicos y perros asintomáticos, sin signos clínicos (53).

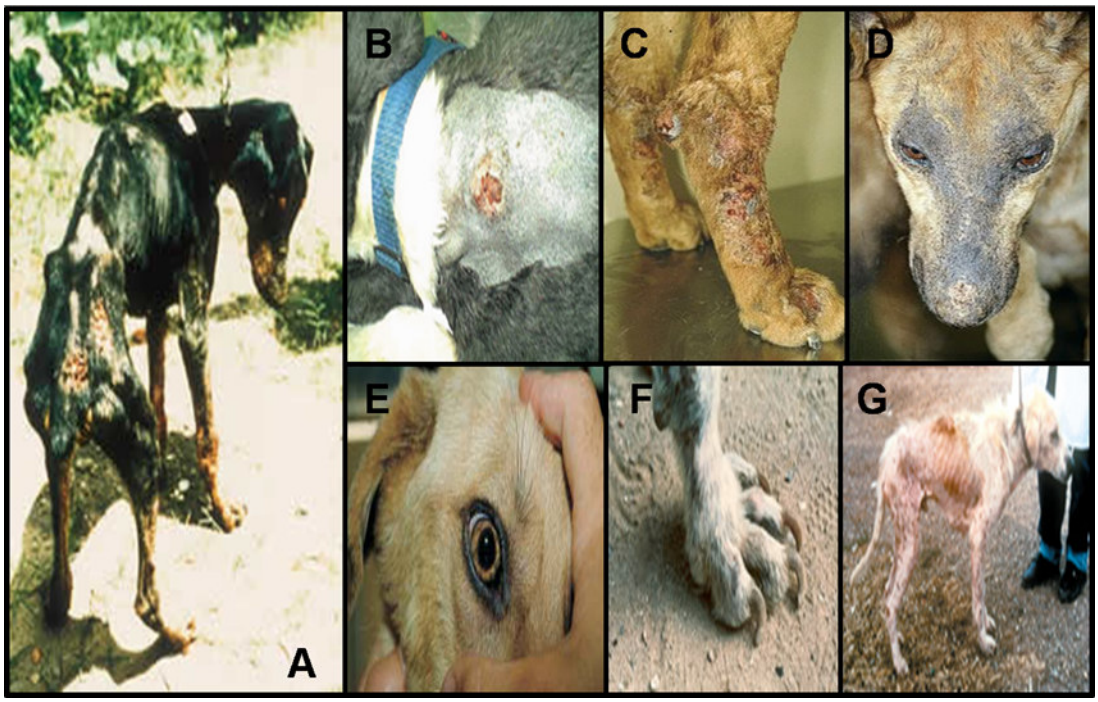

Imagen 4: Signos clínicos en leishmaniasis canina. **A**. Perro con leishmaniasis sintomática, **B** y **C.** úlceras cutáneas, **D.** alopecia, **E.** uveítis, **F.** onicogrifosis y **G.** caquexia. Tomado de: Canine Leishmaniasis: an update**.** Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum Barcelona, Spain, 1999 y www.scalibor.net.

Respuesta Inmunológica

La condición de asintomático (resistencia) o sintomático (susceptibilidad) en perros infectados con *L. infantum* depende de la respuesta inmune desencadenada en el hospedero. Perros infectados de una misma área endémica pueden desarrollar diferentes respuestas celulares a la infección y después de ésta, algunos perros controlan al parásito ya sea por corto tiempo, por años o por el resto de la vida, mientras otros presentan una enfermedad progresiva (54). Los mecanismos involucrados en estos eventos no han sido aún bien establecidos, pero muchos estudios coinciden en la importancia de las respuestas inmunes de tipo Th1 y Th2

en el resultado de la enfermedad, como igualmente ha sido establecido en el modelo murino, en el cual se ha revelado una dicotomía inmunológica a la infección por *Leishmania*: resistencia a la enfermedad esta asociada a una respuesta inmune mediada por células (respuesta tipo Th1) mientras que progresión y muerte están asociadas con una fuerte respuesta humoral (respuesta tipo Th2) (55). Los factores implicados en estos mecanismos están siendo elucidados.

Diagnóstico

La gravedad de la leishmaniasis visceral, así como la connotación zoonótica de la misma, hacen de su diagnóstico un punto de vital importancia. El diagnóstico clínico de la leishmaniasis canina es difícil de establecer debido a su variable sintomatología y debe por ello ser confirmado por métodos parasitológicos, serológicos o de biología molecular. El diagnóstico tradicional de la enfermedad se basa en la detección microscópica del parásito en extendidos teñidos con Giemsa u otros colorantes, procedimiento que a pesar de su bajo costo y fácil realización posee baja sensibilidad (56). El aislamiento del parásito por cultivo *in vitro* a partir de aspirados de nodo linfático (principalmente de ganglio poplíteo) o médula ósea es utilizado para la detección definitiva del parásito. Sin embargo, esta técnica es invasiva, costosa y requiere de mucho tiempo para la obtención de resultados (57). Por ello, la detección de anticuerpos específicos anti-*Leishmania* en suero canino permanece como una importante herramienta diagnóstica. Entre las diferentes pruebas disponibles las más ampliamente utilizadas son la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (58), test de aglutinación directa (DAT) (59), ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA) (60), dot-ELISAs (61) y Western blot (62). Estos ensayos utilizan fracciones antigénicas solubles purificadas del estado promastigote o amastigote, o el antígeno recombinante rK39 que es altamente conservado en las especies viscerotrópicas de *Leishmania*.

Actualmente, diferentes ensayos de PCR han sido desarrollados para la detección en perros de ADN de *Leishmania* a partir de una variedad de muestras clínicas como médula ósea, aspirados de nodo linfático y sangre periférica. Aunque esta técnica no es considerada de uso rutinario en el diagnóstico de la leishmaniasis canina debido a que requiere equipos sofisticados y personal de laboratorio entrenado, ha mostrado ser muy eficiente en el diagnóstico de la enfermedad debido a su alta sensibilidad y especificidad. Entre las secuencias dianas utilizadas para la PCR se encuentran genes del ARN ribosomal (ARNr SSU) (63), ADN del kinetoplasto (64), genes de ARN derivados del mini-exón (65), secuencias genómicas repetitivas (65), regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) (67,68), el gen de la tubulina (69) y el locus génico gp63 (70). A partir de estas dianas la PCR es capaz de detectar ADN de *Leishmania* en las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad y caracterizar al parásito a nivel de género, complejo o especie, paso esencial para el adecuado diseño de estrategias de control y para la administración de un adecuado tratamiento, debido a las diferencias en cuanto al nivel de virulencia y respuesta a varios regímenes quimioterapéuticos en cada una de las especies de *Leishmania*.

3.2 LAS GARRAPATAS

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados de casi todas las clases de vertebrados, entre los cuales se cuentan vertebrados terrestres, aéreos e inclusive reptiles marinos (71). Debido a los hábitos hematofágicos de estos artrópodos, su extensa distribución y asociación a una gran variedad de hospederos, las garrapatas se han convertido en vectores de la más amplia variedad de microorganismos (72, 73).

Taxonomía

La taxonomía actual de las garrapatas considera que los taxones deben ser evolutivamente monofiléticos y que de esta manera la clasificación taxonómica refleje las relaciones filogenéticas de estos organismos (74). Las garrapatas pertenecen al Suborden Ixodida del Orden Acari, que comprenden cerca de 870 especies distribuidas en tres familias: Nuttalliellidae con 1 especie endémica de África, Argasidae con 183 especies e Ixodidae con 685 especies (75).

La familia Argasidae está constituida por el género *Argas* de la subfamilia Argasinae, y los géneros *Ornithodoros*, *Otobius, Antricola y Nothoaspis* de la subfamilia Ornithodorinae (76). La familia Ixodidae es la más diversa y predominante, esta familia se divide en dos grandes grupos, los postriatas constituidos por la subfamilia Ixodinae, y el grupo metastriata compuesto por 442 especies de las subfamilias Bothriocrotoninae, Amblyomminae, Haemaphysalinae, Hyalomminae y Rhipicephalinae (Figura 4) (77,78,79,80).

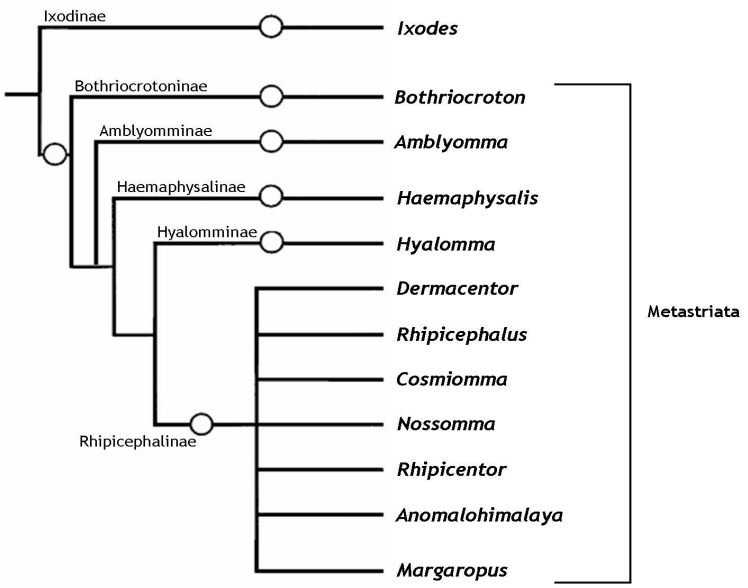

Figura 4. Taxonomía actual de las garrapatas de la familia Ixodidae, y relaciones entre las subfamilias representadas por círculos y los géneros en negrilla.

En América la fauna de garrapatas está representada por especies de los géneros *Argas*, *Ornithodoros*, *Ixodes, Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* y *Rhipicephalus* (81).

Biología

Existen grandes diferencias biológicas entre las tres familias de garrapatas, sin embargo, todas las garrapatas pasan de un estadio de vida al siguiente luego de una ingesta de sangre, la cual puede llegar a ser de 100 veces el peso inicial del ectoparásito y puede realizarse sobre uno, dos o hasta tres hospederos diferentes, dependiendo de la especie Ixodida en cuestión (82).

La garrapata en su estado de larva pasa a ninfa, y de este a adulto, luego de una (Ixodidae) o varias (Argasidae) ingestas de sangre; en el caso de que el adulto sea una hembra, una nueva ingesta sanguínea es requerida luego de la cópula con un macho para realizar la ovoposición de cientos o miles de huevos. Este ciclo de vida puede ser afectado por la humedad y temperatura en su fase no parasítica, es decir cuando la garrapata se aleja del hospedero para realizar la muda, mientras que en la fase parasítica estas condiciones son mantenidas por el cuerpo del animal parasitado (73).

Actualmente se sabe que las preferencias por determinados vertebrados y las diferencias entre los hábitos hematofágicos de las tres familias es el resultado de la adaptación de cada especie de garrapata al comportamiento de su hospedero y su sistema hemostático (83).

Morfología

Morfológicamente las garrapatas poseen dos grandes segmentos corporales, el Gnatosoma o capítulo y el Idiosoma. El Gnatosoma esta constituido por la base del capítulo, quelíceros, palpos e hipostoma, este complejo estructural se encarga de la fijación de la garrapata a la piel del hospedero y la ingesta sanguínea. El Idiosoma se compone de dos subregiones, el podosoma constituido por las coxas, patas y el poro genital (solo en adultos), esta subregión agrupa las estructuras encargadas de la locomoción y reproducción, mientras que el opistosoma está compuesto por los espiráculos y el poro anal, esta subregión se encarga del intercambio gaseoso y las funciones excretoras (84).

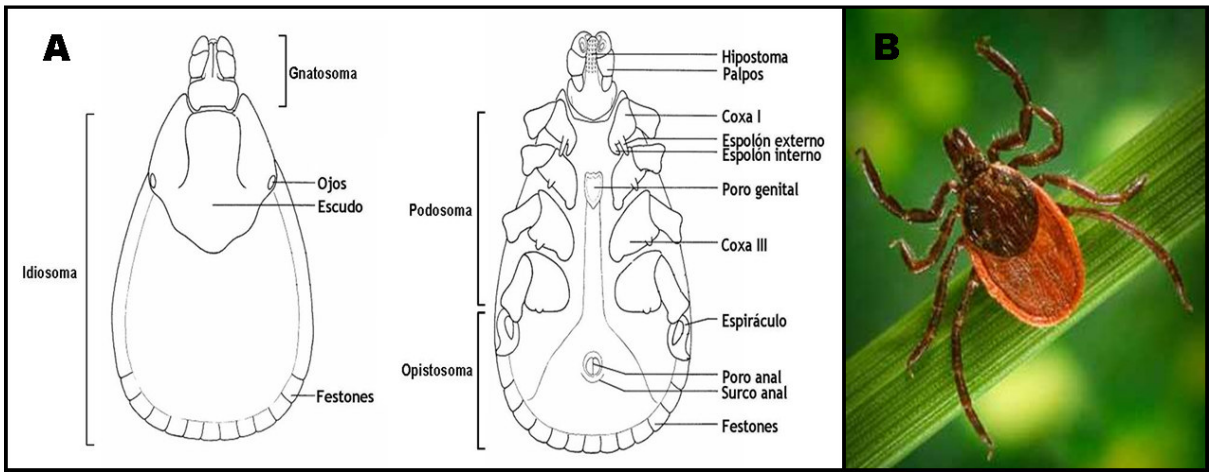

Figura 5. Morfología de Ixodidae, **A.** en vista dorsal y ventral, respectivamente y **B.** ejemplar macho de *Ixodes ricinus.*

En Ixodidae la ubicación del capítulo en la región anterior del cuerpo se mantiene durante todos los estadios de vida, y particularmente la presencia de un escudo dorsal quitinoso es la razón por la cual a las especies de esta familia se les llaman garrapatas duras (Figura 5), mientras que en Argasidae, el capítulo se encuentra en la región ventral del cuerpo (a excepción de las larvas que tienen el capítulo en

la región anterior como en Ixodidae) y no poseen escudo quitinoso dorsal, por tal motivo son conocidas como garrapatas blandas (85) (Figura 6).

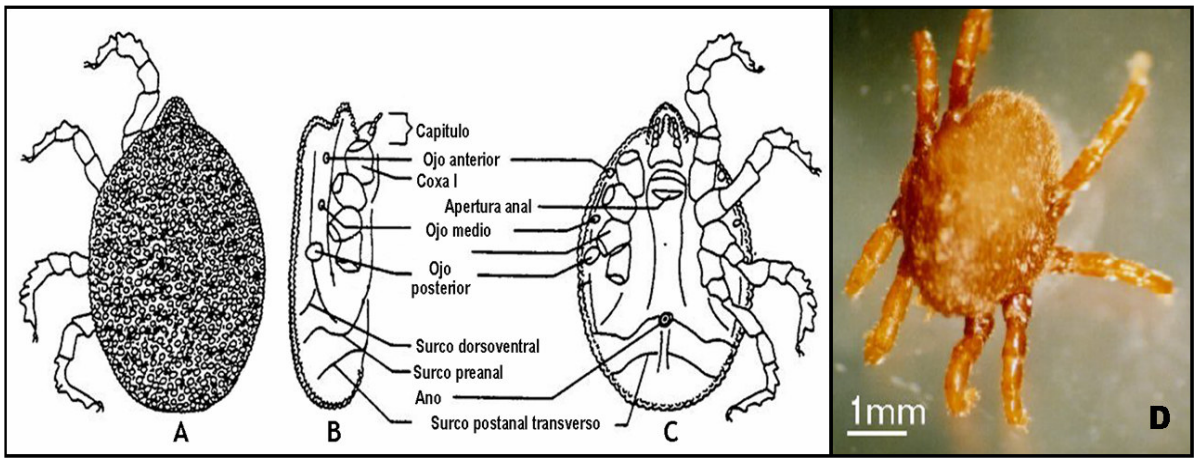

Figura 6. Morfología de Argasidae, en **A.** vista dorsal, **B.** vista lateral**, C.** vista ventral y **D.** ejemplar de *Ornithodoros moubata*.

Enfermedades transmitidas por garrapatas

El potencial vectorial y el riesgo epidemiológico que representan las garrapatas está justificado por las siguientes razones: I) el prolongado período de hematofagia que requieren permite la transmisión bidireccional de agentes patógenos, II) la capacidad de adaptación a nuevos hospederos que facilita el papel de las garrapatas en la transmisión de algunos patógenos a nuevos hospederos, III) la capacidad de sobrevivir a largos períodos de inanición, IV) el potencial reproductor de las hembras que permite depositar cientos o miles de huevos facilitando el incremento de la población de parásitos, V) el gran potencial de dispersión que poseen debido a la fuerte asociación sobre la piel de sus hospederos, VI) el conocido potencial de transmisión de agentes patógenos a través de los sistemas transestadiales (de larva a ninfa y luego a adulto), transovárico (de una hembra a su descendencia) y sexual (entre un macho y una

hembra durante la cópula) y VII) el frecuente hallazgo de garrapatas de importancia médico-veterinaria sobre humanos (81,82).

Las enfermedades transmitidas por garrapatas a los humanos y otros animales son muy numerosas, entre las enfermedades que afectan al hombre se encuentra el grupo de las encefalitis transmitidas por garrapatas y la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo (virus), rickettsiosis, ehrlichiosis, fiebre Q, enfermedad de Lyme, tularemia y fiebres recurrentes (bacterias) y babesiosis (protozoos), además existen registros de parálisis en animales y reacciones anafilácticas por el contacto con proteínas de la saliva de las garrapatas (72,81,84,86).

Las garrapatas como vectores de *Leishmania*

Rhipicephalus sanguineus Latreille, 1806 es la comúnmente denominada garrapata parda del perro, su prevalencia y abundancia es alta en caninos domésticos de todo el mundo y está involucrada como vector de muchos agentes patógenos. Esta especie parece estar actuando como vector de *L. infantum* entre los perros de áreas endémicas de la enfermedad debido a: I) fuerte asociación de esta garrapata a perros con leishmaniasis visceral de focos endémicos, II) mecanismos de alimentación que las convierte en potenciales vectores de microorganismos, III) hábitos hematofágicos obligatorios de las larvas, ninfas y adultos, IV) necesidad de tres hospederos caninos para completar su ciclo biológico, V) bajas tasas de infección natural que exhiben los flebotomíneos y VI) la alta prevalencia de la enfermedad en los caninos domésticos con respecto a los humanos; razones por las cuales se sugirió la participación de *R. sanguineus* en la epidemiología de esta enfermedad (21).

El posible papel que cumplen estas garrapatas en la transmisión de *L. infantum* fue evaluado experimentalmente, demostrándose la infectividad de macerados intestinales de garrapatas alimentadas sobre perros con leishmaniasis visceral al ser inoculados a animales sanos (19,87). Así mismo se demostró que garrapatas

infectadas podían transmitir el patógeno a animales libres de infección y se comprobó la supervivencia de los parásitos, y la retención de la infección por *Leishmania* a través de los estadios de vida de la garrapata, así como la mayor eficiencia del cultivo del parásito en medios de células intestinales de garrapata al compararlo con el cultivo en medios tradicionales (88). Posteriormente, se halló a *R. sanguineus* infectada naturalmente con *L. infantum* (19)

Además, varios investigadores en diferentes regiones en el mundo, reconocen el potencial vectorial de las garrapatas en la transmisión de *Leishmania*, principalmente debido a la aparición de brotes de la enfermedad en regiones no endémicas, los animales afectados no poseen un historial de viaje a zonas endémicas de leishmaniasis visceral canina, y finalmente a la ausencia total de flebotomíneos en tales regiones (16,20,89,90).

En Colombia no se ha estudiado hasta ahora el papel potencial de las garrapatas en el ciclo de transmisión de *L. infantum,* a pesar de la postulación de ellas como vectores alternativos de estos parásitos, dirigiéndose las investigaciones únicamente hacia *Lutzomyia* sp., el vector tradicional de esta enfermedad.

4. METODOLOGÍA

4.1 ÁREA DE ESTUDIO

La investigación fue desarrollada en el departamento de Sucre, en las localidades de Sabanas del Potrero, El Campín y Escobar Arriba, pertenecientes al área rural de los municipios de Sincelejo, Ovejas y Sampués, respectivamente (Figura 7). Estas localidades fueron seleccionadas con base en la existencia de casos activos o antiguos de leishmaniasis humana, y a estudios previos realizados por el Grupo de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre.

Geográficamente, el municipio de Sampués se encuentra ubicado dentro de la subregión Sabanas, en la cual la intensa actividad antrópica y los fenómenos climáticos han modificado el paisaje nativo, mientras que los municipios de Sincelejo y Ovejas hacen parte de la subregión Montes de María, caracterizada principalmente por su paisaje montañoso y los fenómenos de niebla. En términos ecológicos las dos subregiones se clasifican en la zona de vida bosque seco tropical, con registros de temperatura media anual de 27.5°C, humedad relativa de 77-80% y precipitación anual de 1000-1300 mm.

4.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Búsqueda de caninos infectados con *Leishmania*

La búsqueda activa de caninos se realizó en cada casa de las localidades bajo estudio. Los caninos muestreados cumplieron con tres criterios de inclusión: i) residir en las zonas bajo investigación ii) tener una edad igual o superior a los tres

meses y iii) consentimiento informado de sus propietarios para realizar la toma de muestra de sangre y colecta de ectoparásitos.

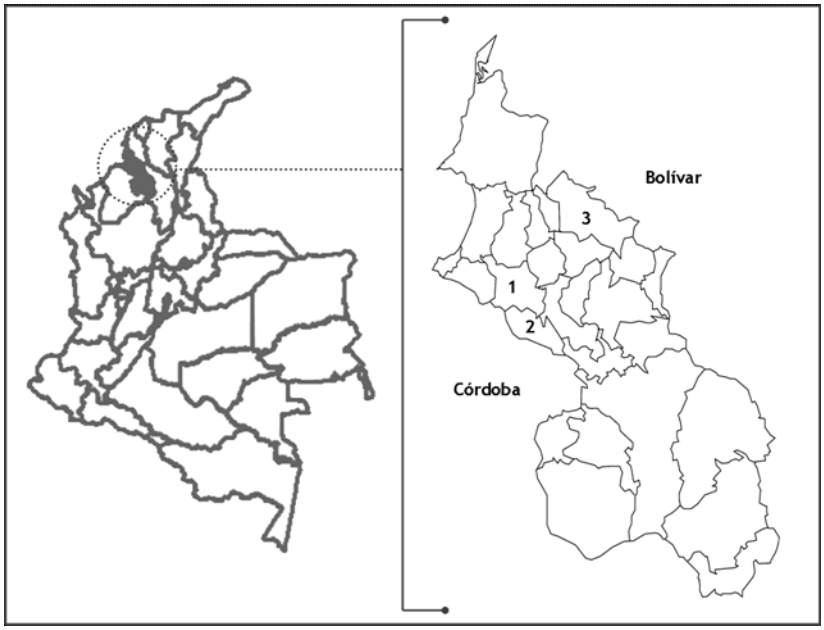

Figura 7. Ubicación geográfica de los municipios del departamento de Sucre, Caribe Colombiano, en los cuales se realizó la búsqueda activa de caninos: **1.** Sincelejo (Sabanas del Potrero), **2.** Sampués (Escobar Arriba) y **3.** Ovejas (El Campín).

Obtención de muestras de sangre

Cada perro incluido en el estudio fue inmovilizado con la finalidad de obtener 5ml de sangre periférica, la cual fue extraída por punción de la vena braquial del animal con la ayuda de una aguja No. 19 colocada en una jeringa desechable; 3mL de la muestra se depositaron en un tubo de vidrio sin anticoagulante y 2mL en microtubos con EDTA, los cuales se destinaron para la obtención de suero y extracción de ADN, respectivamente. A cada animal se le asignó un código de colecta y se tomaron datos básicos como sexo, edad, propietario, presencia de

signos clínicos compatibles con leishmaniasis visceral canina y presencia de garrapatas (Anexo A).

Colecta de garrapatas

De manera simultánea a la obtención de la muestra de sangre, se realizó la búsqueda activa de garrapatas examinando toda la superficie corporal del canino. Los especímenes removidos cuidadosamente de la piel de los animales fueron depositados en viales con etanol al 70%, debidamente rotulados con el código asignado a cada perro y almacenados a -20ºC hasta su identificación taxonómica.

4.3 DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LAS GARRAPATAS

Los ectoparásitos removidos de los animales examinados de las tres localidades fueron observados bajo un estereomicroscopio para determinar la familia y género al cual pertenecen, y un microscopio compuesto para la determinación del sexo, estadio de vida y especie mediante la visualización de sus estructuras externas en montajes temporales en etanol al 70% usando claves de referencia (91,92,93,94). Para la determinación taxonómica precisa de argásidos fue necesario realizar mediciones de varias estructuras externas usando un micrómetro de ocular y el software Image Pro-Plus 5.0® (Media cybernetics).

Las especies de ectoparásitos encontradas fueron confirmadas por expertos internacionales del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina, y la Universidad de la República, Uruguay, especializados en taxonomía del suborden Ixodida.

Individuos de cada especie fueron seleccionados para realizar montajes permanentes en placas portaobjetos con Bálsamo de Canadá, previa maceración

química en lactofenol a 85ºC durante 30 minutos para los adultos y 1 minuto a ebullición para las ninfas y larvas no alimentadas.

4.4 OBTENCIÓN DE SUERO

Con la finalidad de retraer el coágulo sanguíneo y obtener el suero, 3mL de sangre periférica sin anticoagulante se centrifugaron a una velocidad de 3.000 rpm durante 7 minutos. El sobrenadante resultante fue transferido a un vial y almacenado a -20ºC hasta la realización de la prueba de inmunofluorescencia indirecta.

4.5 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

La prueba de inmunofluorescencia indirecta se realizó usando promastigotes de *Leishmania (V) panamensis* (MHOM/CO/UA140) en fase estacionaria temprana de crecimiento, obtenidos por cultivo en medio NNN (Novy, McNeal y Nicolle). El procedimiento llevado a cabo se basó en el procedimiento estándar empleado en el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET). Brevemente, los promastigotes se lavaron tres veces por centrifugación con PBS (buffer fosfato salino) pH 7.2 y se resuspendieron en formol al 4%. Antes de su uso, los promastigotes fueron ajustados a una concentración de $6x10^6$ parásitos/ml en PBS pH 7.2. 20µL de esta suspensión se depositó en cada pozo de la placa para IFI y se almacenaron a temperatura ambiente durante toda la noche. Diluciones dobles seriadas (1:8 hasta 1:128) de suero canino y controles (20µL) se depositaron sobre los pozos cubiertos por el antígeno. Seguidos de incubación por una hora a 37ºC en cámara húmeda, las placas fueron lavadas, teñidas con 20µL del conjugado de anti-IgG de perro marcada con fluoresceína diluida 1:100 más Azul de Evans a concentración 1:100 e incubadas a 37ºC durante 1 hora en

cámara húmeda y oscuridad. Luego de lavar las placas y dejar secar a temperatura ambiente, se depositó glicerol tamponado a cada pozo y se cubrió con láminas cubreobjetos para ser examinadas bajo un microscopio de epifluorescencia.

Se consideró positiva toda muestra de suero que presentara fluorescencia a una dilución mayor o igual a 1:32.

4.6 INFECCIÓN NATURAL DE CANINOS Y SUS GARRAPATAS CON *Leishmania*

4.6.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Extracción de ADN a partir de sangre de caninos

La sangre destinada para extracción de ADN se procesó según el protocolo modificado de Rivero & Blanco 2003 (48), de la siguiente manera: 500µL de sangre fueron centrifugados a 12000 rpm por 5min a 4ºC, al pellet obtenido se adicionaron 495µL de buffer de extracción (Tris 10mM, EDTA 1mM, SDS 1%), se homogenizó e incubó durante 10 min. Después de agregar 5µl de proteinasa K (200µg/ml) e incubar por 1 hora a 55ºC, la proteinasa fue inactivada por ebullición durante 15 min para luego centrifugar las muestras a 12000 rpm por 10 min a 4ºC y adicionar al sobrenadante obtenido 500µl de acetato de potasio 5M e incubar en hielo por 15 min. Seguido de una centrifugación a 12000 rpm por 10 min a 4ºC, al sobrenadante se le adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se incubó a -20ºC toda la noche. Al pellet de ADN resultante se le agregó 1ml de etanol al 70%, se centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4ºC, y se descartó el sobrenadante. Finalmente el ADN se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50µL de agua estéril.

Para verificar la eficiencia del protocolo utilizado para extraer ADN de *Leishmania* a partir de sangre de caninos, se incluyeron como controles de extracción muestras de sangre de perros *Leishmania*-negativos por PCR cebadas con promastigotes de *L. infantum*.

Extracción de ADN a partir de garrapatas

Una vez todas las garrapatas fueron debidamente identificadas, las capturadas en el mismo canino se agruparon por especie y sexo hasta un máximo de 10 individuos. A cada garrapata o grupo de garrapatas se le extrajo el ADN según el protocolo de Aljanabi & Martínez 1997 (95), descrito a continuación: el contenido de cada tubo se homogenizó en 400µL de buffer de lisis salino (0.4M NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0 y 2mM EDTA pH 8.0) con la ayuda de un micropistilo. Luego, 40µL de SDS 20% y 8µL de proteinasa K fueron adicionados y mezclados, y se incubó durante 2 horas a 55-65ºC, seguido por inactivación de la proteinasa K por ebullición durante 10 minutos. A continuación, 300µL de NaCl 6M se adicionaron a cada tubo, se agitó a máxima velocidad en un vórtex durante 30 segundos y se centrifugó a 10300 rpm por 30 min a 4ºC. El sobrenadante obtenido fue transferido a un nuevo tubo, se le adicionó un volumen igual de isopropanol e incubó a -20ºC durante 1 hora. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10300 rpm por 20 min a 4ºC; el pellet resultante se lavó con etanol al 70%, se secó y resuspendió en 50µL de agua estéril destilada.

Para verificar la integridad del ADN después de la extracción, se utilizó como control de extracción garrapatas de un perro libre de la infección por *Leishmania*, cebada con promastigotes de *L. infantum*.

4.6.2 DETECCIÓN DE ADN DE *Leishmania* EN SANGRE DE CANINOS Y EN GARRAPATAS MEDIANTE PCR

La detección de ADN de parásitos del género *Leishmania* fue llevada a cabo usando los cebadores SSU561F y SSU561R, los cuales flanquean una región de aproximadamente 561pb del ADN ribosomal de *L. donovani* (Figura 8). Estos cebadores amplifican esta región en una gran variedad de tripanosomatídeos, incluyendo las especies de los géneros *Trypanosoma, Chritidia, Leptomonas*, entre otras, con diferencias en el tamaño del producto amplificado (63).

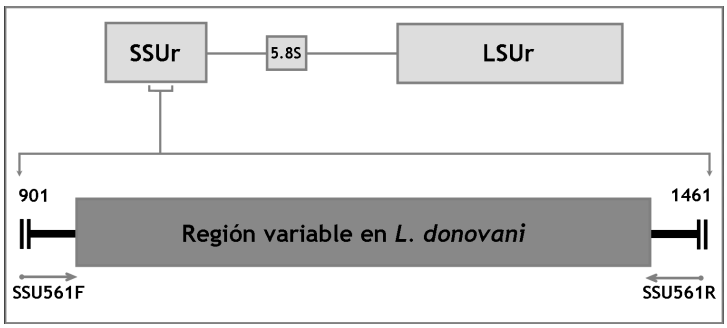

Figura 8. Estructura del operón ribosomal de *L. donovani* mostrando la secuencia blanco de los cebadores SSU561F/R.

En cada PCR se incluyó un control positivo correspondiente al ADN de *L. infantum* y un control negativo constituido por agua estéril en lugar de ADN, con la finalidad de determinar si existía inhibición de la reacción o contaminación de la misma. La secuencia de los cebadores, condiciones de la mezcla de reacción y perfil térmico de amplificación son especificados en la Tabla 1 y 2.

Cebador	Secuencia	Cóctel PCR 25µL
SSU561F	**5**-TGGGATAACAAAGGAGCA-**3**	2.5mM $MgCl_2$, 200µM dNTP`s, 20pmol cebadores, 1.5U Taq Polimerasa
SSU561R	**5**-CTGAGACTGTAACCTCAAAGC-**3**	

Tabla 1. Cebadores y condiciones del cóctel de reacción para PCR

Etapas	T(Cº)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94ºC	5	1
Amplificación cíclica	94ºC 54ºC 72ºC	1 1 1	35
Extensión final	72ºC	5	1

Tabla 2. Perfil térmico del protocolo de amplificación con los cebadores SSU561F/R

Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.25% en buffer TBE 0.5X durante 60 minutos a 95 voltios, previa tinción con bromuro de etidio (concentración final 0.5µg/mL) y visualizadas por exposición a luz ultravioleta en un transiluminador.

En cada electroforesis fue usado un control positivo, un control negativo y un marcador de peso molecular con el fin de estimar los tamaños de las bandas obtenidas mediante el programa LabImage 1D 2006. Una muestra fue considerada positiva cuando un producto de PCR de aproximadamente 560pb fue detectado.

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos fueron tabulados y procesados con el software Excel 2003 Microsoft® para la creación de tablas y gráficas, para facilitar a su vez la presentación y el análisis de los resultados. Considerando el propósito y las características de esta investigación, este estudio es de tipo descriptivo basado en proporciones (96).

5. RESULTADOS

5.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio estuvo constituida por un total de 134 perros, 83 pertenecientes a la localidad de Sabanas del Potrero, 42 a Escobar Arriba y 9 a El Campín; el 41.8% de los perros eran hembras y el 58.2% machos (Figura 9). La mayor parte de la población canina estaba conformada por perros mestizos jóvenes (Figura 10). Los perros en las localidades eran mantenidos fuera de las viviendas durante la noche.

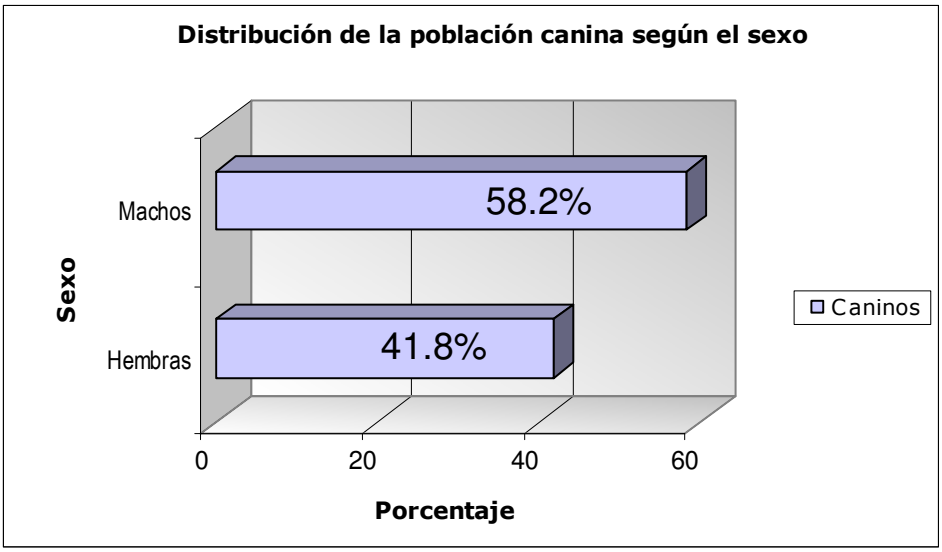

Figura 9. Distribución de la población canina bajo estudio según el sexo

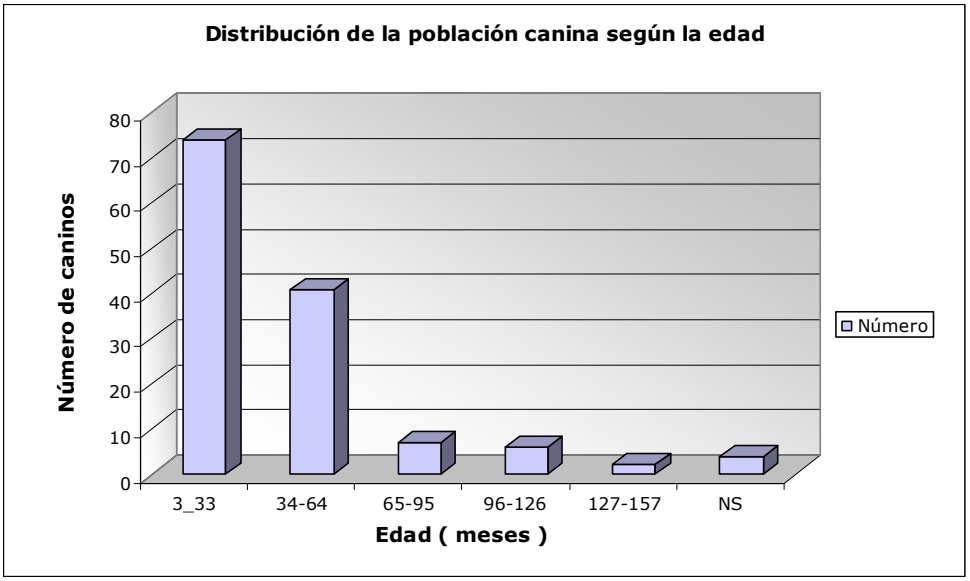

Figura 10. Distribución de los perros estudiados según la edad.

En un bajo número de perros se observaron signos clínicos externos compatibles con leishmaniasis visceral canina. Los principales signos clínicos fueron lesiones cutáneas (onicogrifosis y alopecia) y caquexia (Imagen 5).

Imagen 5. Perros de las localidades bajo estudio infectados con *Leishmania* spp. **A.** Perro sintomático y **B.** Perro asintomático.

5.2 SEROPREVALENCIA DE LA LEISHMANIASIS CANINA POR IFI

De los 122 caninos examinados por IFI, el 69.67% (85/122) presentaron títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* ≥ a 1:32 (IFI positivo). Las seroprevalencias por localidad fueron del 72% (54/75), 68.4% (26/38) y 55.6% (5/9) en Sabanas del Potrero, Escobar Arriba y El Campín, respectivamente.

Sólo 6 caninos no presentaron anticuerpos contra el parásito, mientras que el resto de la población (31/122) mostraron títulos de anticuerpos por debajo del valor de corte (Figura 11) (Anexo B).

De los 85 perros seropositivos, el 17.6 % presentaron signos clínicos de la enfermedad y el 49% perteneció al grupo etáreo de 3 a 33 meses.

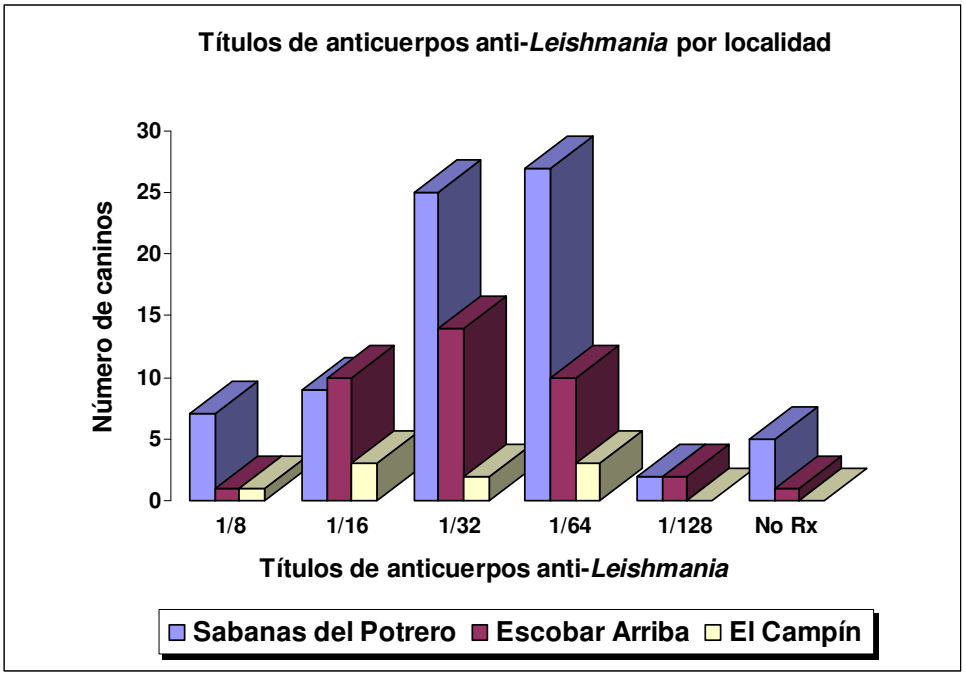

Figura 11. Títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* detectados mediante IFI en la población canina de cada localidad.

5.3 INFECCIÓN NATURAL DE CANINOS CON *Leishmania* POR PCR

A partir del ADN extraído de muestras de sangre periférica se amplificó un fragmento de ~560pb de la subunidad ribosomal pequeña de *Leishmania*. Este gen fue detectado en el 35% (29/83), 35.7% (15/42) y 11% (1/9) de los perros analizados en Sabanas del Potrero, Escobar Arriba y El Campín, respectivamente (Imagen 6). Adicionalmente, los cebadores SSU561F y SSU561R amplificaron una banda de ~650pb en algunos perros de las tres localidades. Ambas bandas se presentaron en dos perros de Sabanas del Potrero y dos de Escobar Arriba, mientras que en un perro de El Campín sólo se observó esta banda de mayor peso molecular (Imagen 7).

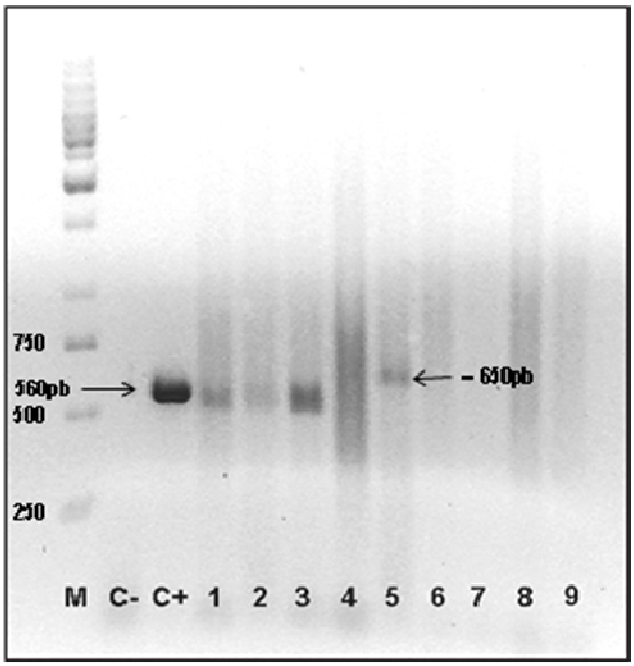

Imagen 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.25% de los productos amplificados con los cebadores SSU561F/R. **M.** Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb Ladder); **C-.** Control negativo; **C+.** Control positivo, ADN de *L. infantum*; **1-3.** Muestras de perros positivos para ADN de *Leishmania*; **4,6-9.** Muestras de perros negativas y **5.** Muestra de perro positiva para *Trypanosoma* sp.

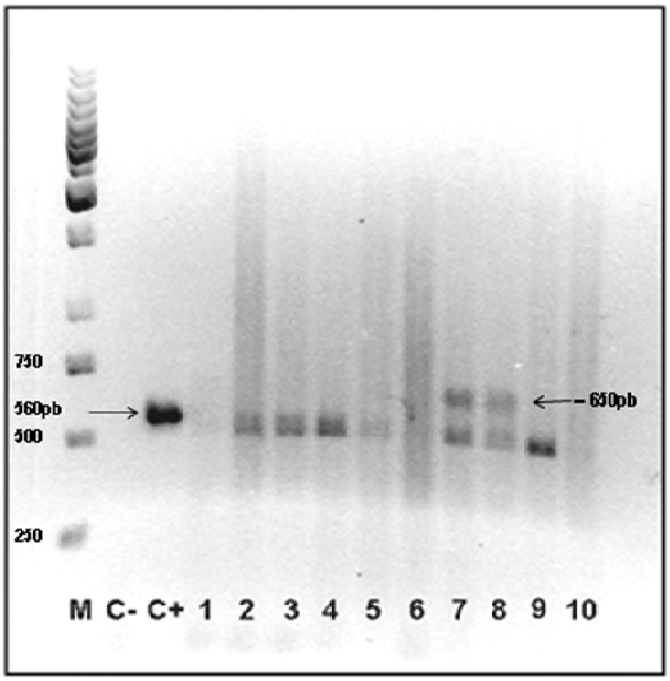

Imagen 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.25% de los productos amplificados con los cebadores SSU561F/R. **M.** Marcador de peso molecular (Gene Ruler 1Kb Ladder); **C-.** Control negativo; **C+.** Control positivo, ADN de *L. infantum*; **1,6,10.** Muestras de perros negativos; **2-5 y 7-9.** Muestras de perros positivas para ADN de *Leishmania*; en el carril **7** y **8** se presenta una banda adicional correspondiente a *Trypanosoma* sp.

Utilizando el software especializado para análisis de electroforesis LabImage 1D 2006 Professional, se realizó el análisis del tamaño de los fragmentos amplificados por PCR, de acuerdo al criterio RF (Running Front), ajustado mediante el algoritmo de corrección para la migración de fragmentos Valley-to-Valley. Se determinó que todas las bandas encontradas a nivel del control positivo constituido por el producto de amplificación de *L. infantum*, tienen un tamaño del fragmento amplificado consistente con las especies de *Leishmania* spp. (aproximadamente 560pb), mientras que las bandas de mayor tamaño ubicadas por encima del control positivo son consistentes con las especies del género *Trypanosoma*

(superior a los 630pb), las cuales poseen fragmentos de tamaño superior cuando se realiza la PCR con estos cebadores (Figura 12)(97).

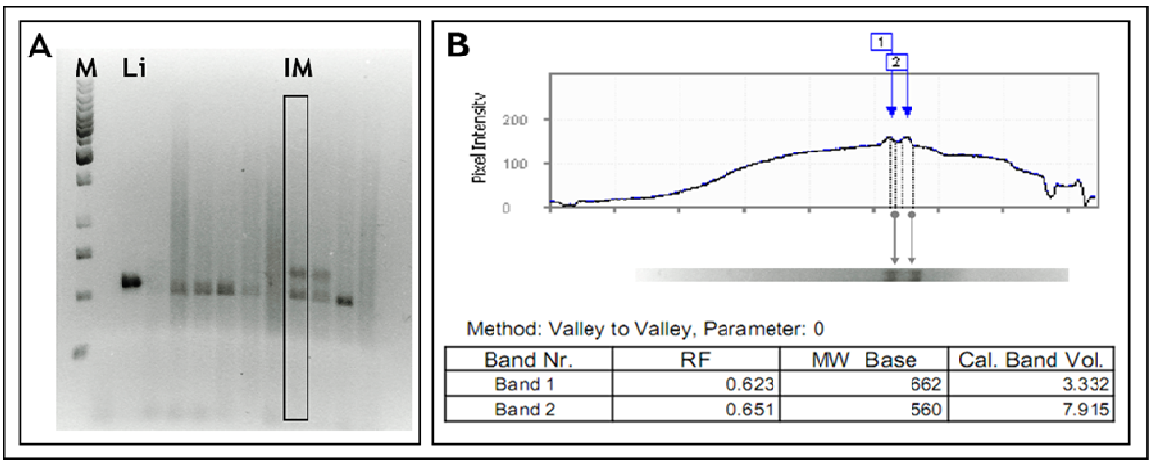

Figura 12. Análisis de los fragmentos amplificados por PCR usando los cebadores SSU561F/R. **A**. Electroforesis en gel de agarosa al 1.25% de los productos de PCR, M: marcador de peso molecular 1Kb, Li: Control positivo de *L. infantum*, e IM: muestra de sangre de perro con infección mixta de *Leishmania* y *Trypanosoma*. **B**. Análisis de los fragmentos amplificados en la muestra IM de la imagen A, mostrando los tamaños estimados usando el software LabImage 1D 2006 Professional.

Del total de los perros positivos por PCR, el 41% presentaron signos clínicos compatibles con leishmaniasis visceral canina y el 45.6% tenían de 3 a 33 meses de edad. La Tabla 3 resume los resultados de las pruebas de PCR e IFI, obtenidos a partir de las muestras de los perros estudiados.

LOCALIDAD	PCR+	IFI +	PCR+/IFI+	PCR+/IFI-	PCR-/IFI+	PCR-/IFI-
Sabanas del Potrero	29/83	54/75	18	5	36	16
Escobar Arriba	15/42	26/38	8	4	18	8
El Campín	1/9	5/9	1	1	3	4
Total	45/134	85/122	27	10	57	28

Tabla 3. Diagnóstico comparativo de *Leishmania* en muestras de sangre de perros.

5.4 ESPECIES DE GARRAPATAS ASOCIADAS A LA POBLACIÓN CANINA

En las tres localidades muestreadas se recolectaron 420 garrapatas a partir de 50 perros infestados, de una población total de 134 caninos examinados, lo que corresponde a una tasa de infestación del 37,3%. El 93.1% de las garrapatas identificadas pertenecieron a la familia Ixodidae, que estuvo representada por 387 individuos de *R. sanguineus* (131 adultos, 198 ninfas y 58 larvas), 3 individuos de *R. (B) microplus* Canestrini, 1887 (1 hembra y 2 ninfas) y una hembra de *A. ovale* Koch, 1844 (Imagen 8). De la familia Argasidae se recolectaron 29 (6,9%) larvas parcialmente alimentadas, integrantes de la subfamilia Ornithodorinae, las cuales fueron identificadas como *Ornithodoros (Alectorobius) puertoricensis* Fox, 1947 (Imagen 9). Cuatro de estas últimas larvas se capturaron a partir de un perro de la localidad de El Campín, 15 en siete caninos de Sabanas del Potrero y las diez restantes se encontraron en siete perros de Escobar Arriba (Tabla 4). Es importante resaltar que las características morfológicas de todos los especímenes argásidos, al igual que los valores morfométricos de las estructuras de interés taxonómico fueron consistentes con las descritas para *O. puertoricensis* (Tabla 5).

LOCALIDAD	**ESPECIES DE GARRAPATAS**			
	A. ovale	***R. microplus***	***R. sanguineus***	***O. puertoricensis***
Sampués	0	0	5	10
Sincelejo	1	3	381	15
Ovejas	0	0	1	4
TOTAL	**1**	**3**	**387**	**29**

Tabla 4. Número total de individuos por especie de garrapatas recolectados en tres localidades del departamento de Sucre, Caribe Colombiano.

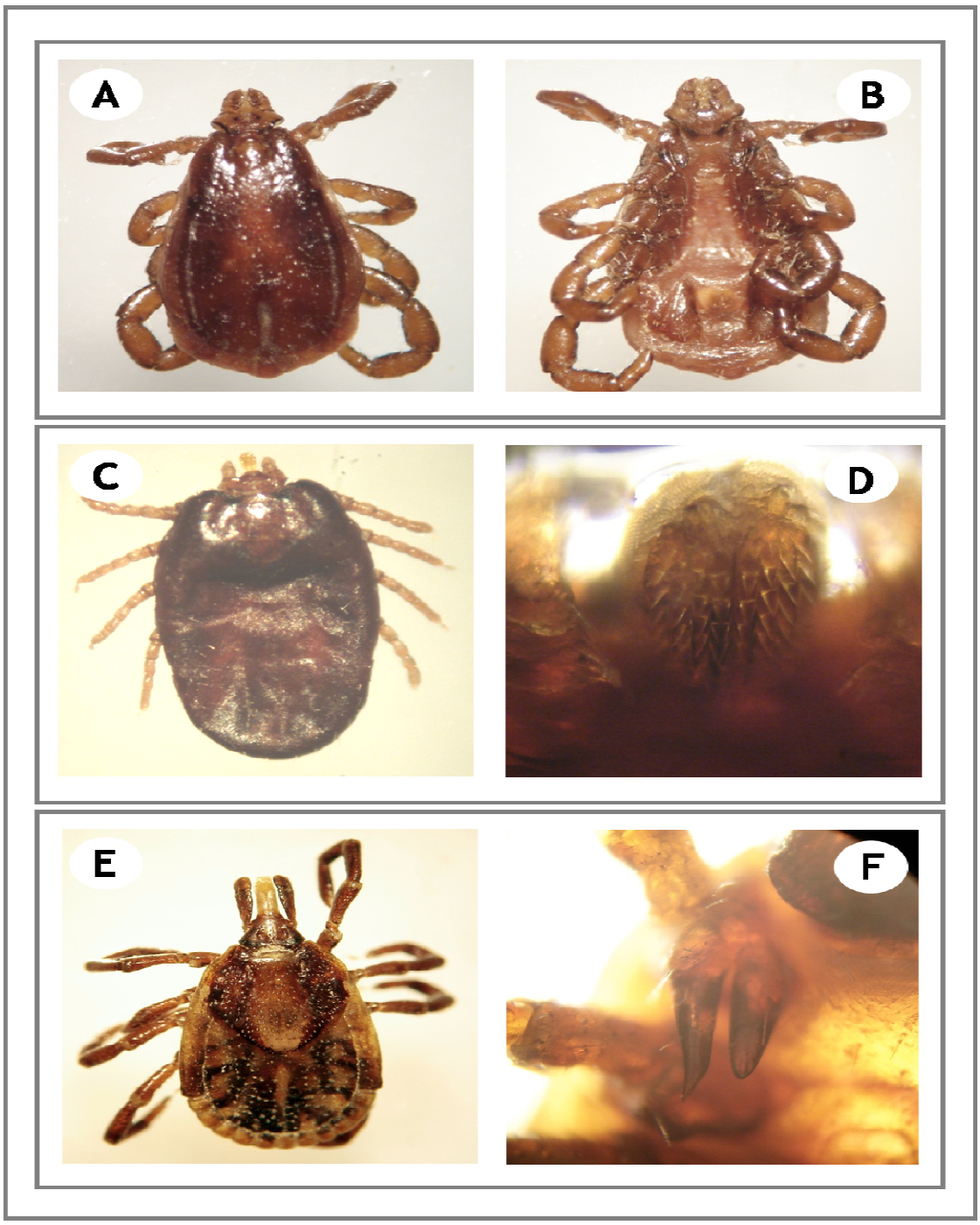

Imagen 8. Garrapatas de la familia Ixodidae encontradas en el departamento de Sucre. *R. sanguineus*: **A.** vista dorsal y **B.** vista ventral de un macho, *R.* (*B*) *microplus*: **C.** vista dorsal de una ninfa y **D.** dentición del hipostoma de una hembra, *A. ovale*: **E.** vista dorsal de una hembra y **F.** coxa I de una hembra.

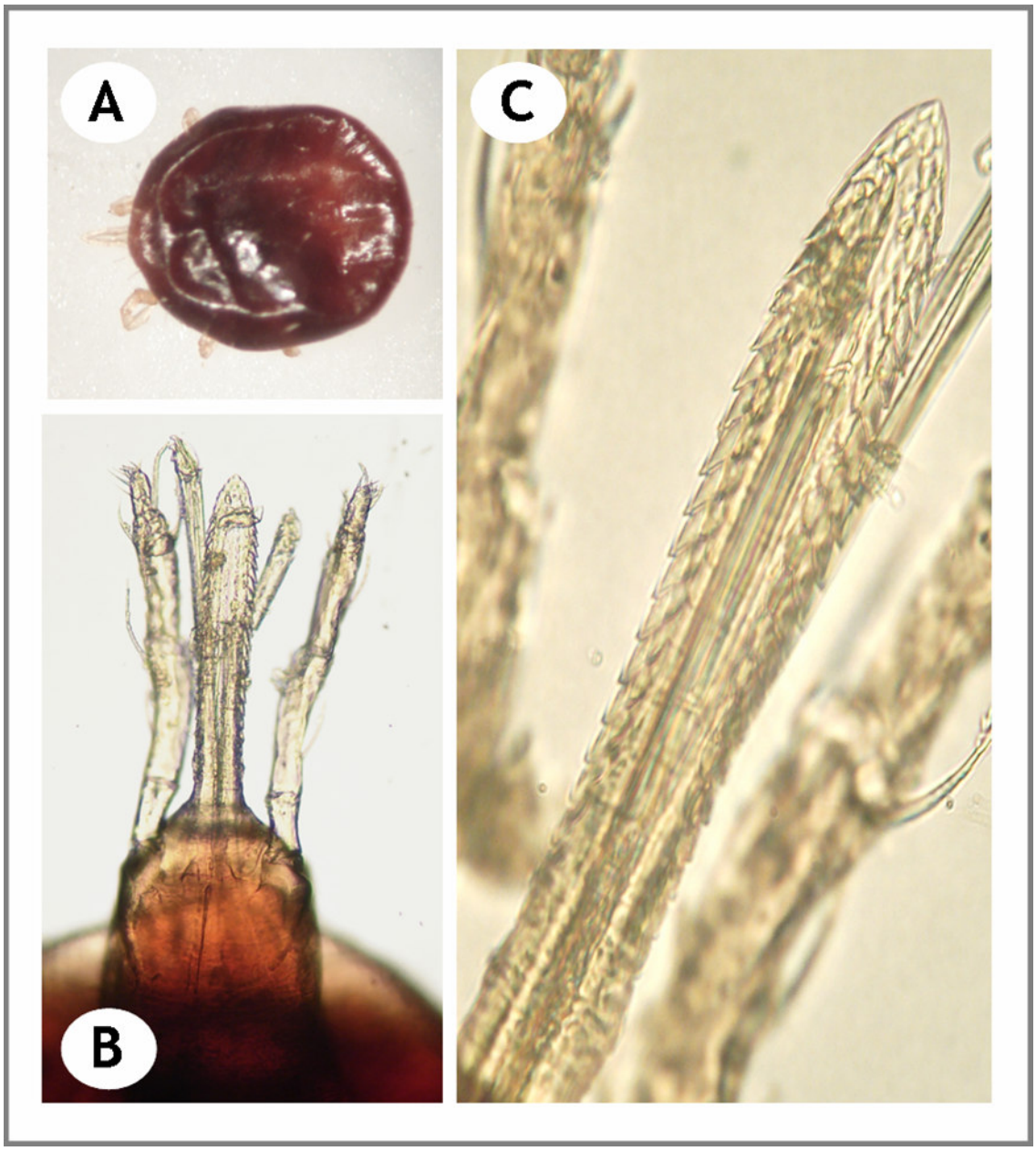

Imagen 9. Caracteres morfológicos de *Ornithodoros puertoricensis*: **A.** Vista dorsal de una larva parcialmente alimentada. **B.** Morfología de la base del capítulo y tamaño de los palpómeros con respecto a su hipostoma. **C.** Hipostoma de una larva con 3 hileras de dentículos en la zona apical del hipostoma.

Caracter Morfológico	Valor estándar *O. talaje*	Valor estándar *O. puertoricensis*	Valor *O. puertoricensis* de Colombia
Longitud del hipostoma	0.165-0.177	0.244-0.257	0.245
Amplitud del hipostoma	0.047-0.065	0.038-0.045	0.040
Longitud del segundo palpómero	0.078	0.108	0.109
Longitud del cuarto palpómero	0.034	0.037	0.037
Longitud base capitulo	0.148-0.174	0.117-0.145	0.142
Amplitud base capitulo	0.186-0.216	0.156-0.187	0.168

Tabla 5. Estimaciones morfométricas de los especímenes de *O. puertoricensis* del Caribe Colombiano y valores de referencia usados para distinguir *O. puertoricensis* y *O. talaje*. Todas las medidas están expresadas en milímetros. Se resalta que la proporción entre la longitud del segundo y cuarto palpómero en *O. talaje* es aproximadamente 2, mientras que en *O. puertoricensis* es cercana a 3.

5.5 INFECCIÓN NATURAL DE GARRAPATAS CON *Leishmania* POR PCR

El ADN obtenido de 86 extracciones realizadas a partir de un individuo o grupo de ectoparásitos fue utilizado como molde para amplificar el ADNr 16S de parásitos del género *Leishmania* con los cebadores SSU561F y SSU561R. Sin embargo, no se observó el producto de ~560pb correspondiente al tamaño esperado para las especies de este género.

6. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que un porcentaje importante de la población canina que habita en áreas endémicas para la leishmaniasis visceral humana en el departamento de Sucre padece infección con parásitos del género *Leishmania.* Esto se podría atribuir a que los perros residentes en zonas rurales permanecen la mayor parte del tiempo en el exterior de las viviendas principalmente durante la noche, debido a que ellos son utilizados como guardianes. Ésta característica podría explicar el alto porcentaje de perros positivos que fueron diagnosticados empleando las técnicas de IFI y PCR, ya que ellos están fácilmente expuestos a la picadura del insecto vector *Lu. evansi* que generalmente exhibe altas densidades peridomiciliarias (37), con un horario de actividad que comienza a las 18:00 horas y se extiende hasta las 6:00 horas, presentando los mayores picos de actividad desde las 23:00 hasta la 01:00 horas y antes del amanecer (28).

Aunque perros positivos para la leishmaniasis visceral presentaron signos clínicos compatibles con la enfermedad, el mayor porcentaje de ellos eran asintomáticos (59% y 82.4% de los perros positivos por PCR y IFI, respectivamente). Estos resultados están de acuerdo con estudios realizados por otros autores (51,54) quienes indican que la mayoría de la población canina de áreas endémicas para la enfermedad permanece asintomática. Esta condición de aparente resistencia parece estar relacionada con el desarrollo de una respuesta inmune celular protectiva que permite el control de la infección en el animal (51,55). Por otro lado, la existencia de perros negativos por ambos métodos diagnósticos pero con signos clínicos característicos de la leishmaniasis visceral canina, puede ser explicado por el mimetismo de esta infección con otras enfermedades, mostrando

lesiones no específicas similares a aquellas observadas en otros desórdenes infecciosos e inmunomediados (51). Esto demuestra la necesidad de emplear no solo el diagnóstico clínico sino la combinación de éste con técnicas moleculares y serológicas para el correcto diagnóstico de esta enfermedad.

Los pocos estudios previos en el departamento de Sucre han reportado prevalencias a la infección por *Leishmania* en caninos del 10 y 17.24% (48) usando PCR, en el municipio de Sampués en el 2003, y del 3,8% por IFI (49) en la década del ochenta en el municipio de Ovejas. Esto contrasta fuertemente con las prevalencias encontradas en este estudio, las cuales son mucho más elevadas, alcanzando valores del 35.7% y 72%, por PCR e IFI, respectivamente. Estos datos confirman la importancia del perro como el principal reservorio y fuente de infección del insecto vector en el ciclo doméstico de transmisión del parásito e indican el progresivo aumento de la enfermedad en perros de estas zonas debido a la carencia de medidas para el control de la leishmaniasis en estos animales.

Otros tripanosomatídeos con fragmentos de tamaños similares a los de *Leishmania* no fueron considerados para el diagnóstico molecular, principalmente debido a la naturaleza de los organismos en sí, y a la ausencia de reportes de estos organismos en la región, como es el caso de los géneros, *Endotrypanum* y *Leptomonas*. *Endotrypanum*, es el género de la familia Trypanosomatidae más cercano a *Leishmania*, y aunque el producto esperado de PCR de estas especies es similar (aproximadamente 550pb) al de *Leishmania* con estos cebadores, las especies de este género son parásitos intraeritrocíticos de los perezosos (Edentata: Bradypodidae) y no han sido registrados en ninguna otra familia de mamíferos (97). Por otra parte, *Leptomonas* también genera fragmentos de PCR con tamaños similares, sin embargo, es conocido el hecho de que estos tripanosomatídeos solo infectan insectos y no ha sido reportada su infección en caninos (98).

De los 85 perros seropositivos, 57 (67%) fueron PCR negativos, en estos perros fue imposible detectar ADN del parásito a pesar de presentar anticuerpos anti-*Leishmania.* Diversas razones explican este aspecto, por un lado la baja posibilidad de encontrar parásitos en sangre debido a que ellos permanecen sólo de manera transitoria en este tejido, albergándose principalmente en hígado, bazo o nodos linfáticos (51,99) y por el otro, la sangre contiene una serie de inhibidores de PCR que pueden afectar la sensibilidad del ensayo (100).

Desde otro punto, la técnica de PCR es capaz de detectar perros infectados que son seronegativos, en este estudio 9 de 37 (24%) perros positivos por PCR resultaron negativos por la técnica de IFI, lo que esta relacionado con el tipo de respuesta inmune que desarrolle el animal infectado; muchos perros desarrollan una respuesta inmunológica celular con una baja o nula producción de anticuerpos, que les permite controlar el desarrollo de la enfermedad (101). Además, la serología no detecta perros infectados en período pre-patente de la enfermedad, así como aquellos perros seropositivos que seroconvierten, pero aún permanecen infectados (102).

El alto número de perros diagnosticados como positivos por la técnica de IFI sugiere también la necesidad de revisar a futuro el valor de corte de 1:32 que se usa tradicionalmente para discriminar los animales positivos de negativos, considerando que la endemicidad de la región podría eventualmente aumentar la sensibilidad de la técnica y la posibilidad de un diagnóstico serológico erróneo. Es importante destacar que la técnica de IFI con títulos de 1:32 es el criterio estándar usado por las entidades de salud estatales y los centros de investigación para el diagnóstico serológico de leishmaniasis canina en el país. Sin embargo, la constante exposición de los perros a la picadura del vector infectado en estos focos endémicos podría favorecer la presencia, en la mayoría de ellos, de anticuerpos contra el parásito, razón por la cual se justifica reexaminar los parámetros que determinan la dilución a la cual una muestra es considerada

positiva. Sin embargo, es importante mencionar que en el presente estudio se detectó un número importante de perros con títulos iguales o superiores a 1:64, lo que reafirma la presencia de una infección activa en los caninos de estas localidades.

Aunque el perro es el principal animal doméstico, a la fecha se desconocían las especies de garrapatas que parasitan a la población canina del Caribe Colombiano. Más aún, con la excepción de los trabajos de Osorno-Mesa (103), López (104), Cardona & Rubio (105), López & Parra (91) y López et al (106), las garrapatas ectoparásitos de caninos han sido poco estudiadas en el territorio nacional, a pesar de su importancia en el ciclo epidemiológico de diversas enfermedades antropozoonóticas. La riqueza de la ixodofauna asociada a caninos domésticos del área rural del departamento de Sucre, integrada por especies de la familia Ixodidae y Argasidae refleja, de cierta manera, la complejidad de las relaciones biológicas entre las especies animales de la Costa Norte del país.

Gran parte de los ectoparásitos recolectados pertenecen a la familia Ixodidae (391), particularmente al género *Rhipicephalus*, que estuvo representado por *R. sanguineus*, y *R. (B) microplus*. *R. sanguineus* fue la especie más abundante, confirmando una vez más al perro como su principal hospedero (107,108), mientras que *R. (B) microplus* parasita comúnmente al ganado. La presencia de *R. (B.) microplus* en perros se puede explicar por la cercanía de éstos al ganado bovino local, si bien existen varios informes de su parasitismo sobre otros animales (75).

Aunque en varios países de América, *A. ovale* es comúnmente recolectada en perros (109), el hallazgo de una sola hembra de esta especie sugiere un contacto esporádico entre los animales silvestres que puedan actuar como hospederos, y los caninos domésticos de la zona de Sabanas del Potrero, indicando que la especie es poco común en perros de la región.

La presencia de *O. (A) puertoricensis* en perros de las tres localidades muestreadas, es un hallazgo de relevancia debido a que esta garrapata es considerada un ectoparásito habitual de los roedores (110). No obstante, el registro de *O. (A) puertoricensis* en caninos puede ser atribuido a la constante exposición de perros de estas zonas a diversos vertebrados silvestres que habitualmente actúan como hospederos, los cuales son atraídos al entorno humano por cultivos y poblaciones animales, facilitando la adaptación de *O. (A) puertoricensis* al hospedero canino. En este sentido, la presencia de la especie en dos subregiones del departamento de Sucre, Montes de María y Sabanas, indica que el parasitismo de la garrapata en perros de estas áreas rurales no es un evento ocasional y que por el contrario podría ser un fenómeno común, hasta ahora desconocido, en esta región del país, destacándose entonces el registro de *Canis familiaris* como nuevo hospedero de *O. (A) puertoricensis* en América.

Aunque en estudios anteriores, *R. sanguineus* fue encontrada naturalmente infectada con parásitos del género *Leishmania*, en nuestro caso no se encontró a esta garrapata con *Leishmania* u otro parásito tripanosomatídeo, esta situación sugiere que no existe participación de este acarino en la transmisión de leishmaniasis visceral canina en este foco endémico de la enfermedad en Colombia. Existen varias razones que podrían explicar porque en este estudio las garrapatas no fueron halladas naturalmente infectadas con parásitos del género *Leishmania*, en primer lugar se debe considerar las características intrínsecas de los perros, la mayoría de la población canina positiva para la infección por *Leishmania* era asintomática, en estos perros el desarrollo de una respuesta de tipo celular controla la diseminación del parásito, y por tanto la intensidad y frecuencia de la parasitemia en sangre (51) y con ello la posibilidad de que el parásito sea ingerido por el artrópodo. Por otro lado, factores intrínsecos de *R. sanguineus* de las localidades bajo estudio pueden también afectar el establecimiento de *Leishmania* en esta garrapata. *R. sanguineus* presenta diferencias biológicas entre subpoblaciones de diferentes lugares de América,

África y Europa (111), como son la capacidad alimenticia, actividad metabólica y duración del ciclo biológico; estas diferencias podrían explicar en cierto grado la ausencia de *Leishmania* en algunas subpoblaciones, que se han tornado refractarias a la infección por el parásito a través de la estrecha relación de *R. sanguineus* con perros infectados con *L. infantum*. Además, existe la posibilidad de encontrar sustancias en tracto digestivo y hemolinfa que puedan inhibir el desarrollo de *Leishmania*, como sugieren los hallazgos realizados en estos y otros arácnidos (112,113,114).

A pesar de que las garrapatas que parasitan perros de áreas endémicas para leishmaniasis canina en el departamento de Sucre no se hallaron infectadas con parásitos del género *Leishmania*, se requieren más estudios en otras regiones y focos endémicos del país para determinar el papel de estos ectoparásitos hematófagos de caninos como potenciales transmisores de *Leishmania* spp, debido a que la leishmaniasis es una enfermedad compleja y dinámica, por lo cual los resultados obtenidos en una región determinada no pueden *per se* extrapolarse a otras sin una previa comprobación experimental.

7. CONCLUSIONES

La prevalencia de la leishmaniasis visceral canina en focos endémicos para la enfermedad en el departamento de Sucre es alta, demostrando el importante papel que desempeña el perro como reservorio del parásito en estas zonas. Los principales signos clínicos presentes en los animales infectados fueron caquexia, onicogrifosis y alopecia. Sin embargo, la mayor parte de la población infectada permanece asintomática, indicando que el diagnóstico clínico de esta enfermedad en caninos no es suficiente para establecer una verdadera infección y debe por ello ser combinado con el diagnóstico serológico o molecular.

La especie de garrapata *R. sanguineus* comúnmente infesta a caninos en el departamento de Sucre; a pesar de su presencia en animales infectados con parásitos del género *Leishmania* no fue posible detectar infección por este parásito en ninguna de las especies de garrapatas encontradas. Por ello, estos artrópodos no pueden ser incriminados como vectores de *Leishmania* spp. en focos endémicos para leishmaniasis visceral en el departamento de Sucre.

Con el hallazgo de *O. (A) puertoricensis* parasitando perros de Escobar Arriba, Sabanas del Potrero y El Campín se registra a *Canis familiaris* como nuevo hospedero de esta especie de garrapata en América.

8. RECOMENDACIONES

Considerando las altas tasas de infección con parásitos del género *Leishmania* en perros de zonas rurales del departamento de Sucre y su cercanía al hombre, sugerimos la evaluación de medidas de control de la enfermedad en este reservorio debido al gran riesgo de infección para el humano.

Debido a la alta seroprevalencia de la leishmaniasis canina encontrada en este estudio y considerando la gran proporción de perros que tendrían que ser sacrificados en estas zonas para controlar la enfermedad, es necesario reevaluar el título de anticuerpos al cual una muestra es considerada positiva, teniendo en cuenta el menor número de perros diagnosticados como positivos por PCR.

Se sugiere la utilización de cebadores que amplifiquen secuencias que estén presentes en mayor número de copias en el genoma del parásito con la finalidad de aumentar la sensibilidad de la técnica de PCR, así como cebadores que permitan determinar las especies tripanosomatídeas que infectan la población canina de estas localidades. Además, evaluar la utilidad de otros tejidos para el diagnóstico de la enfermedad.

9. REFERENCIAS

1. Reithinger R & Davies CR. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. Trends Parasitol 2002; 18(7): 289-90.
2. Palatnik-De-Sousa CB, Dos Santos WK, França-Silva JC, Da Costa RT, Barbosa A, Palatnik M, Mayrink W & Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med & Hyg 2001; 65: 39-44.
3. Pearson R & de Queiroz Sousa A. Clinical spectrum of leishmaniasis. Clin Infect Dis 1996; 22: 1-13.
4. World Health Organization. Leishmaniasis. Fourteenth Programme Report. UNDP/World Bank/Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases Research Progress 1997-1998. Genova. WHO, 1999; 1-6.
5. Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi G Jr, Pontes-de-Carvalho LC & Oliveira-dos-Santos AJ. A cross-secctional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med & Hyg, 1996; 55: 39-44.
6. Ashford DA, David JR, Freire M, Sherlock I, da Conceicão E, Pedral D & Badaro R. Studies on control of visceral leishmaniasis: Impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. Am J Trop Med & Hyg, 1998; 59: 53-57.
7. SIVIGILA 2005. Informes de Cierre de Grupos Transmisibles: Leishmaniasis. Instituto Nacional de Salud.
8. SISTEMA DE VIGILANCIA EN SALUD PÚBLICA-SIVIGILA 2007. Semana Epidemiológica 52. Instituto Nacional de Salud.

9. Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Morales A, Ferro de Carrasquilla C, Young DG, Kreutzer RD, Boshell J, Palau MT, Cáceres E & Peláez D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Am J Trop Med & Hyg, 1989; 40: 480-486.
10. Travi BL, Vélez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C & Montoya J. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1990; 84: 676-677.
11. Ferro C, Morrison AC, Torres M, Pardo R, Wilson ML & Tesh RB. Age structure, blood-feeding behavior, and *Leishmania chagasi* infection in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. J Med Entomol, 1995; 32: 618-629.
12. Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD, Barazarte R, Travi BL & Lane RP. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. Acta Trop, 2003; 85: 19-29.
13. Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniosis in the State of Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1996; 91: 671-683.
14. Ryan L, Silveira FT, Lainson R & Shaw JJ. *Leishmania* infections in *Lu. longipalpis* and *Lu. antunesi* (Diptera: Psychodidae) on the island of Marajó, Pará State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1984; 78: 547-548.
15. Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L & Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis transmission rate estimated from a cohort study in Amazonian, Brazil. Parasitology, 1997; 115: 143-156.
16. Gaskin AA. Schantz P, Jackson J, Birkenhever A, Tomlinson L, Gramiccia M, Levy M, Steurer F, Kollmar E, Hegarty BC, Ahn A & Breitschwerdt EB. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. J Vet Intern Med, 2002; 16: 34-44.
17. Monti DJ. Hunters hounded as leishmaniasis is diagnosed in Foxhounds. J Vet Intern Med, 2000; 12: 1887-1890.

18. Dantas-Torres F, Faustino M, Lima OC & Acioli RV. Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop, 2005; 38 (5): 444-445.
19. Coutinho MT, Lacerda L, Sterzik A, Toshio R, Botelho JR, De Maria M, Genaro O & Linardi PM. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol, 2005; 128: 149-155.
20. Lipscomp T. Veterinary Pathology Conference. The Armed Force Institute of Pathology. Washington DC. 2004.
21. Dantas-Torres F. Do any insects other than phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) transmit *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from dog to dog? Vet Parasitol, 2006; 136: 379-380.
22. Dantas-Torres F, Aguiar L & Brandão-Filho S. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39:64-67.
23. Sánchez-Saldaña L, Sáenz-Anduaga E, Pancorbo-Mendoza J, Zegarra-Del-Carpio R, Garcés-Velasco N, Regis-Roggero A. Leishmaniasis. Dermatol Peruana, 2004; 14(2).
24. Alvar J. Las leishmaniasis: de la biología al control. 2ª ed. Servicio de Parasitología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2001.
25. Luna AL, Martinez LP & Rebollo JA. Determinación de las especies de *Leishmania* causantes de leishmaniasis cutánea en el departamento de Sucre. Tesis. Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de Biología con Énfasis en Biotecnología, 2007.
26. Arias J, Beltrán F, Desjeux P & Walton B. Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio. Cuaderno técnico No. 44. Washington, D.C. Organización Panamericana de la Salud, 1996; pág.1-63.

27. Rosypal AC. Characterization of canine leishmaniasis in the United States: pathogenesis, immunological responses, and transmission of an American isolate of *Leishmania infantum*. PhD Thesis Faculty of the Virginia Polytechnic Institute & State University, 2005.
28. Vélez ID, Travi BL, Gallego J, Palma GI, Agudelo S, Montoya J, Jaramillo C & Llano R. Evaluación ecoepidemiológica de la leishmaniasis visceral en la comunidad indígena Zenú de San Andrés de Sotavento, Córdoba: primer paso para su control. Revista Colombiana de Entomología, 1995; 2(3): 111-122.
29. Travi BL, Osorio Y, Becerra MT & Adler GH. Dynamic of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the indisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1998; 92: 275-278.
30. Ampuero J. Leishmaniasis. Ministerio de Salud del Perú. Módulos Técnicos, 2000. Serie Documentos Monográficos N°8.
31. Ordeñana R. Optimización de la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) para la identificación de especies de *Leishmania*. Tesis Msc. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" Departamento de Parasitología, 2005.
32. Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C & Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. Am J Med Hyg, 2001; 64: 119-124.
33. Young D & Duncan M. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Memoirs of the American Entomological Institute Number 54, 1994.
34. Montoya-Lerma J & Ferro C. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. Instituto Nacional de Salud, 1998; p 33.

35. Bejarano E, Uribe S, Rojas W & Vélez ID. Presence of *Lutzomyia evansi*, a vector of American visceral leishmaniasis, in an urban area of the colombian caribbean coast. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2001; 95: 27-28.
36. Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramillo C, Llano R & Vélez ID. Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera.Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Colombia. J Med Entomol, 1996; 33(3): 278-285.
37. Cochero S & Blanco P. Papel de *Lutzomyia evansi* (Diptera:Psychodidae) como vector de leishmaniasis visceral en un foco en los Montes de María. Tesis Universidad de Sucre, Facultad de Educación y Ciencias, Programa de Biología con Énfasis en Biotecnología, 2002.
38. Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O, Souza AA & Silveira FT. Amazonian visceral leishmaniasis distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1990; 85: 135-137.
39. Gomes B, Mendonça IL, Silva V, Ruas J, Silva M, Cruz M, Barral A & Costa C. Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cerdocyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2006; 101: 127-133.
40. Mello D, de Rego F, Oshozo E & Nunes V. *Cerdocyon thous* (L.) (Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas, 1973) in Corumbá (Mato Grosso Do Sul State, Brazil). Mem Inst Oswaldo Cruz, 1988; 83(2): 259.
41. Baneth G & Jaffe C. Canine visceral leishmaniasis in Israel: an overview of an emerging disease with reference to wild canids and human infection. From *Canine Leishmaniasis: an update* (Ed. R. Killick-Kendrick). *Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum,* Barcelona, 1999; pp 40-44.
42. Travi BL, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Goncalves A & Velez ID. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma*

(Schizotrypanum) *cruzi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Colombia. Am J Trop Med Hyg, 1994; 50(5): 557-565.

43. Corredor A, Gallego JF. Tesh RB, Morales A, Ferro C, Young DG, Kreutzer RD, Boshell J, Palau MT, Caceres E & Pelaez D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. Am J Trop Med Hyg 1989; 40: 480-486.
44. Gramiccia M & Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. Int J Parasitol, 2005; 35: 1169-1180.
45. Dantas-Torres F & Brandao-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2006; 48: 151-156.
46. Dantas-Torres F. The rol of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis.* Vet Parasitol, 2007; 149: 139-146.
47. Cortés LA. Foco de leishmaniasis en El Hobo, municipio del Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. Biomédica, 2006; 26 (Suplemento 1): 236-241.
48. Rivero M & Blanco P. Identificación de *Leishmania chagasi* en *Canis familiaris* en un foco de los Montes de María. Tesis, Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de Biología con Énfasis en Biotecnología, 2003.
49. Fernández J, Charry T, Bello FJ, Escovar J, Ayala M, Nicholls RS, Moncada L, Corredor A & López M. Prevalencia de leishmaniosis canina en 17 veredas de los municipios de Neiva, Tello y Algeciras (Huila-Colombia). Revista de Investigación No. 1, Universidad de La Salle, 2002; 1(Supl. 1): 106-118.
50. Fernández J, Bello F, López M, Moncada L, Vargas J, Ayala M, Nicholls R & Lozano C. Seroprevalencia de leishmaniasis visceral canina en la comuna 8 de Neiva y en cuatro municipios de Huila, Colombia. Biomédica, 2006; 26 (Supl. 1): 121-30.

51. Ferrer LM. Clinical aspects of canine leishmaniasis. From *Canine Leishmaniasis: an update* (Ed. R. Killick-Kendrick). *Proceedings of a Canine Leishmaniasis Forum,* Barcelona, 1999; 6-10.
52. Gállego M. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 2004; 23(2): 661-676.
53. Moreira M, Luvizotto M, Garcia JF, Corbett C & Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. Vet Parasitol, 2007; 145: 245-252.
54. Moreno J & Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol, 2002; 18(9): 399-405.
55. Kramer L, Calvi LE & Grandi G. Immunity to *Leishmania infantum* in the dog: Resistance and Disease. Vet Res Commun, 2006; 30(Suppl. 1): 53-57.
56. Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. *In* Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum, 2002; pp. 7-14.
57. Mathis A & Deplazes P. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. J Clin Microbiol, 1995; 33: 1145-1149.
58. Fernández-Pérez FJ, Méndez S, de la Fuente C, Gómez-Muñoz MT, Cuquerella M & Alunda JM. Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. Am J Trop Med Hyg, 1999; 61(4): 652-653.
59. Harith AE, Slappendel RJ, Reiter I, van Knapen F, de Korte P, Huigen E & Kolk AH. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. J Clin Microbiol, 1989; 27: 2252-2257.
60. Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H & Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for

serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. J Clin Microbiol, 2005; 43(11): 5515-5519.

61. Vercammen F, Berkvens D, Brandt J & Vansteenkiste W. A sensitive and specific 30-min Dot-ELISA for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in the dog. Vet Parasitol, 1998; 79: 221-228.
62. Aisa MJ, Castillejo S, Gallego M, Fisa R, Riera MC, de Colmenares M, Torras S, Roura X, Sentis J & Portus M. Diagnostic potencial of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. Am J Trop Med Hyg, 1998; 58:154-159.
63. Noyes H, Perez A & Chance M. *Leishmania herreri* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) than to *Leishmania.* Mol Biochem Parasitol, 1996; 80: 119-123.
64. Gomes A, Ferreira I, Lima M, Cunha E, Garcia A, Araújo M, Pereira-Chioccola V. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. Vet Parasitol, 2007; 144: 234–241.
65. Fernandes O, Murthy V, Kurath U, Degrave W & Campbell D. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. Mol Biochem Parasitol, 1994; 66: 261-271.
66. Piarroux R, Fontes M, Perrazo R, Gambarelli F, Joblet C, Dumon H & Quilici M. Phylogenetic relationships between Old World *Leishmania* strains reveled by analysis of a repetitive DNA sequence. Mol Biochem Parasitol, 1995; 73: 249-252.
67. Cupolillo E, Grimaldi JG, Mamen H & Beverley SM. Intergenic Region Typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol, 1995; 73: 145-155.
68. Eisenberger CL & Jaffe CL. *Leishmania*: Identification of Old World using a permissively primed intergenic polymorphic polimerase chain reaction. Exp Parasitol, 1999; 91: 70-77.

69. Orué A, Hidalgo M, De Abreu N, Luis L, García H, Rodríguez N & Mendoza-León A. Marcadores moleculares en *Kinetoplastida*: Secuencias diagnósticas de DNA nuclear de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* y el desarrollo de un ensayo múltiple de PCR (*Multiplex PCR*) en la identificación del parásito. Mems Inst Biol Exp, 2005; 4: 121-124.
70. Victoir K, Banuls AL, Arévalo J, Llanos-Cuentas A, Hamers R, Noel S, De Doneker S, Le Ray D, Tibayrenc M & Dujardin JC. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia.* Parasitology, 1998; 117: 1-13.
71. Venzal JM, Estrada-Peña A, Fernández de Luco D. Efects produced by the feeding of larvae of *Ornithodoros aff. puertoricensis* (Acari: Argasidae) on laboratory mice. Exp Appl Acarol, 2007; 42: 217-223.
72. Jongejan F & Uilenberg G. The global importance of ticks. Parasitology, 2004; 129: S3-S14.
73. Oliver J Jr. Biology and systematics of ticks (Acari:Ixodidae). Ann Rev Ecol Syst, 1989; 20: 397-430.
74. Barker S & Murrell A. Systematics and evolution of ticks with a list valid genus and species names. Parasitology, 2004; 129: S15-S36.
75. Guglielmone AA, Szabó MP, Martins JR & Estrada-Peña A. Diversidade e importancia de carrapatos na sanidade animal. In: Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de importancia médico-veterinaria da regiao neotropical: um guia ilustrada para identificaçao de especies 2006; pp. 115-138.
76. Venzal JM & Estrada-Peña A. Larval feeding performance of two Neotropical Ornithodoros ticks (Acari:Argasidae) on reptiles. Exp Appl Acarol, 2006; 39: 315-320.
77. Black W, Klompen J & Keirans J. Phylogenetic relationships among tick subfamilies (Ixodida:Ixodidae:Argasidae) based on the 18S nuclear rDNA gene. Mol Phyl Evol, 1997; 7(1): 129-144.

78. Murrell A, Campbell N & Barker S. A total evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. Mol Phyl Evol, 2001; 21(2): 244-258.
79. Barker S & Murrell A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. Exp Appl Acarol 2002; 28: 55-68.
80. Horak I, Camicas JL & Keirans J. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari:Ixodida): a world list of valid tick names. Exp Appl Acarol, 2002; 28: 27-54.
81. Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, Mangold AJ, Szabó MP, Martins JR, González-Acuña D & Estrada-Peña A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. Exp Appl Acarol, 2006; 40: 83-100.
82. Marquez-Jimenez F, Hidalgo-Pontiveros A, Contreras-Chova F, Rodriguez-Liébana J & Muniain-Ezcurra M. Las garrapatas (Acarina:Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2005; 23(2): 94-102.
83. Mans B, Louw A, Neitz A. Evolution of hematophagy in ticks: common origins for blood coagulation and platelet aggregation inhibitors from soft ticks of the genus *Ornithodoros*. Mol Biol Evol, 2002; 19(10): 1695-1705.
84. Mullen G & Durden L. Medical and Veterinary Entomology, 4ª Ed. Elsevier Academic Press 2002, 597 p.
85. Goddard J. Physician´s Guide to Arthropods of Medical Importance, 4th Edition. CRC Press, 467 p.
86. Acero S, Blanco R & Bartolomé B. Anaphylaxis due to a tick bite. Allergy, 2003; 58: 824-831.
87. Blanc G & Caminopetros J. La transmision du Kala-Azar méditerranéen par ane tique: *Rhipicephalus sanguineus*. Academie des Sciences Parasitologie 1937.

88. Mackenzie K. A study of transmission of canine leishmaniasis by the tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille), and a ultrastructural comparison of the promastigotes. Oklahoma State University 1984, PhD Thesis.
89. Bravo L, Frank L & Brenneman K. Canine leishmaniasis in the United States. Small Animal Parasitol, 1993; 15(5): 699-707.
90. Silva OA, Silva P, Silva OV, Braga G, Albuquerque A, Queiros N, Rocha M & Silva E. La leishmaniose viscerale canine dans le Nord-est du Bresil: aspects epidemiologiques. Bull Soc Pathol Exot, 2007; 100: 49-50.
91. López G & Parra D. *Amblyomma neumanni*, Ribaga 1902. Primera comprobación en Colombia y claves para las especies de *Amblyomma*. Rev ICA 1985; 20: 152-162.
92. Strickland RK, Gerrish RR, Hourrigan JL & Schubert GO. Ticks of veterinary importance. Animal & Plant Health Inspections. Service of the U.S. Dep of Agric 1976; Handbook 485, pp. 1-122.
93. Cooley RA. The genera *Boophilus*, *Rhipicephalus* and *Haemaphysalis* (Ixodidae) of the New World. National Institute of Health Bulletin 1946, No. 187.
94. Kohls G, Sonenshine D & Clifford C. The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). II. Identification of the larvae of the western hemisphere and description of three new species. Ann Entomol Soc Am 1965; 58(3): 331-364.
95. Aljanabi S & Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucl Acids Res, 1997; 25(22): 4692-4693.
96. Stevenson M. An Introduction to Veterinary Epidemiology. EpiCentre, IVABS, Massey University, 2005.
97. Noyes H, Arana B, Chance M & Maingon R. The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania:* their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. J Euk Microbiol, 1997; 44(5): 511-517.

98. Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov A, Alexandrov K, Podlipaev S & Maslov D. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: Polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. J Eukaryot Microbiol, 2001; 48(2): 161-169.
99. Leontides L, Saridomichelakis M, Billinis C, Kontos V, Koutinas A, Galatos A & Mylonakis M. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dog with polymerase chain reaction and serology in Greece. Vet Parasitol, 2002; 109: 19-27.
100. Reithinger R, Quinnell R, Alexander B & Davies C. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: Comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. J Clin Microbiol, 2002; 40(7): 2352-2356.
101. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J & Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J Clin Microbiol, 2002; 29(2): 560-563.
102. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, Del Real G & Ruitenberg J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infect Immun, 1994; 62(1): 229-235.
103. Osorno-Mesa E. Las garrapatas de la República de Colombia. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales 1940; IV:6-24.
104. López G. Bioecología y distribución de garrapatas. In: Control de garrapatas. Instituto Colombiano Agropecuario 1980 (Compendio No. 39).
105. Cardona E & Rubio JD. Prevalencia de garrapatas (Acari: Ixodidae) en perros, *Canis familiaris* de nueve municipios del oriente antioqueño. Resúmenes XXXIII Congreso de Entomología SOCOLEN 2006. Página 103.

106. López G, Zuñiga I, Villar C & Osorio G. Distribución de garrapatas en 25 municipios del departamento de Antioquía. Rev ICA 1985; 20: 40-44.
107. Evans DE, Martins JR & Guglielmone AA. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95: 453-470.
108. González-Acuña D, Venzal JM & Guglielmone AA. Primer registro de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae) en *Rattus norvegicus* (Mammalia:Rodentia) en Chile. Gayana 2003; 67(1): 120-121.
109. Guglielmone AA, Estrada-Peña A, Mangold AJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Martins JR, Venzal JM, Arzua M & Keirans JE. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. Vet Parasitol 2003; 113: 273-288.
110. Endris R, Keirans J, Robbins R & Hess W. *Ornithodoros (Alectorobius) puertoricensis* (Acari:Argasidae): Redescription by scanning electron microscopy. J Med Entomol 1989; 28(3): 146-154.
111. Szabó M, Mangold A, João C, Bechara G & Guglielmone A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. Vet parasitol, 2005; 130: 131–140.
112. Da Silva P. Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana.* Tese de Doutor, Universidade de São Paulo. 2002.
113. Bulet P, Stöcklin R & Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunol Rev, 2004; 198: 169-184.
114. Boulanger N, Bulet P, Lowenberger C. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. Trends Parasitol, 2006; 22 (6): 262-268.

ANEXOS

ANEXO A

ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA: ECTOPARÁSITOS DE CANINOS Y LA LEISHMANIASIS VISCERAL

I. Generalidades del ambiente de los Caninos

Localidad:_____
Nombres:_____ Apellidos:_____
Ocupación_____ Tiempo de residencia en la zona_____

Conoce lo que es la Leishmaniasis: Sí___ No___
Conoce sus Vectores: Sí___ No___
¿Alguno de sus familiares ha padecido la Enfermedad? Sí: ___ No: ___
Migración de la población a lugares enzooticos: Si:__ No:__ Donde: _____
¿Han fallecido personas el año anterior a causa de la leishmaniasis? Si___ No: ___
¿Cuántas? ____

¿Cuantas personas habitan en la vivienda?_____
< 5 años: ___ ; 5-14 años: ___ ; > 15 años: ___
Cuáles de los siguientes animales tiene en casa:
Perro(s) ___ Gato(s)___ Gallinas ___
Otros ¿cuáles?_____

II. Encuesta epidemiológica de los Caninos

Cuantos perros conviven con usted: _____
Los perros descansan al interior de la vivienda: Sí: ___ No: ___
¿El perro ha viajado con usted a lugares donde la enfermedad es endémica? Sí: ___ No: ___
¿Alguno de sus perros tiene cachorros? Si: ____ No___ ¿Cuántos? ____
¿Conoce acerca de la Leishmaniasis Canina? Sí: ___ No: ___
¿Ha observado la presencia de garrapatas en su(s) perro(s) en los 2 últimos meses? Sí: ___ No: ___
¿Ha observado la presencia de garrapatas en la casa (paredes, terraza, patio…)? Sí: ___ No: ___
¿Lo han picado alguna vez? Si: ___ No: ___

¿Ha observado la presencia de pulgas en su (s) perro (s)? Si: ___ No: ___

II. Encuesta clínica de los Caninos

NOMBRE	NOMBRE DEL PROPIETARIO	EDAD	SEXO	RAZA	TIEMPO DE PERMANENCIA EN LA ZONA	PROCEDENCIA (en caso de tenerla)	MASCOTA O GUARDIÁN	CÓDIGO

CÓDIGO	SIGNOS CLINICOS

OBSERVACIONES:_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

ANEXO B

Información detallada de los caninos estudiados y resultados de las técnicas de diagnóstico realizadas.

NOMBRE		PCR	IFI	Presencia de garrapatas
Sabanas del Potrero				
1	Neko	Negativo	1:32	Si
2	Compañero	Negativo	No reacciona	Si
3	Pulgoso	Negativo	1:16	Si
4	Peluche	Negativo	1:8	No
5	Capitán	Positivo	1:32	No
6	Comcel	Negativo	1:64	No
7	Caperuza	Negativo	1:64	Si
8	Estrella	Negativo	No realizado	No
9	Yoryi	Negativo	1:8	No
10	La negra	Positivo	1:16	No
11	Pequi	Positivo	1:32	Si
12	Pelusa	Negativo	1:8	No
13	Peluche	Negativo	1:8	No
14	Sabache	Negativo	No reacciona	No
15	La negrita	Negativo	1:8	No
16	Luna	Positivo	No realizado	No
17	Zorro	Negativo	1:128	No
18	Betovén	Positivo	1:8	No
19	Mocho	Negativo	No reacciona	No
20	Ponqui	Negativo	1:64	No
21	Fifí	Negativo	No realizado	No
22	Susi	Positivo	1:64	Si
23	Tommy	Positivo	1:32	Si
24	Linda	Negativo	1:64	No
25	Scott	Negativo	1:64	No
26	Stokinger	Negativo	1:64	Si
27	Rey	Negativo	1:64	Si
28	Terri	Positivo	1:64	Si
29	Chocolate	Negativo	1:64	Si
30	Manchas	Positivo	No reacciona	No
31	Tigra	Negativo	1:32	Si
32	3 en 1	Positivo	1:64	Si

33	Ringo	Negativo	1:64	No
34	Mishi	Negativo	1:16	No
35	Negra	Negativo	1:32	No
36	Paca	Negativo	No reacciona	No
37	Botica	Positivo	No realizado	No
38	Lasi	Positivo	1:16	No
39	Tonki	Negativo	1:64	No
40	Tigre	Negativo	1:32	No
41	Roni	Positivo	1:32	No
42	Caín	Negativo	1:32	No
43	Kiko	Negativo	1:64	Si
44	Pulgoso	Negativo	1:64	No
45	Neko	Negativo	1:64	Si
46	Homero	Negativo	1:64	Si
47	Botija	Negativo	1:64	Si
48	Manchas	Negativo	1:32	No
49	Dino	Negativo	1:32	No
50	Rocki	Positivo	No realizado	Si
51	Regalo	Negativo	1:64	Si
52	Sin nombre	Negativo	1:32	Si
53	Sol	Positivo	1:32	Si
54	Luna	Negativo	1:64	Si
55	Dama	Negativo	1:64	Si
56	Estrellita	Positivo	1:16	No
57	Irabú	Positivo	1:64	No
58	Coronel	Negativo	1:32	No
59	Chela	Negativo	1:16	No
60	Tigre	Positivo	1:32	No
61	Tobi	Positivo	1:32	No
62	Mancha	Negativo	1:8	No
63	Boby	Negativo	1:32	No
64	Susi	Negativo	1:64	No
65	Kimba	Negativo	1:32	No
66	Wally	Positivo	1:32	Si
67	Toby	Negativo	1:16	Si
68	Yogui	Negativo	1:32	Si
69	Dunga	Negativo	1:64	Si
70	Estrella	Positivo	No realizado	Si
71	Chiqui	Positivo	1:64	Si
72	Tarzán	Negativo	1:32	Si
73	Firulai	Negativo	1:64	Si
74	Rex	Positivo	1:32	Si
75	Firubi	Negativo	1:16	No

76	Sombra	Negativo	1:64	Si
77	Camila	Positivo	No realizado	Si
78	Policia	Positivo	1:32	Si
79	Terry	Positivo	No realizado	No
80	Pinki	Negativo	1:16	Si
81	Chiqui	Positivo	1:128	Si
82	Negro	Positivo	1:32	Si
83	Estrella	Positivo	1:32	Si
Escobar Arriba				
84	Dora	Negativo	1:16	No
85	Kaiser	Positivo	No realizado	No
86	Peca	Negativo	1:64	No
87	Globi	Negativo	1:32	No
88	Piquito	Negativo	1:64	No
89	Banqui	Negativo	1:64	No
90	Solita	Positivo	1:32	No
91	Negro	Positivo	1:64	No
92	Laika	Negativo	1:32	Si
93	Sarita	Negativo	1:16	No
94	Benyí	Positivo	1:32	No
95	Tainer	Positivo	1:64	No
96	Lula	Negativo	1:32	No
97	Lulita	Negativo	1:16	Si
98	Monita	Negativo	1:32	Si
99	Lester	Negativo	1:32	Si
100	Pacho	Negativo	1:64	No
101	Betoven	Negativo	1:16	No
102	Neron	Negativo	1:16	No
103	King	Negativo	1:32	Si
104	Capi	Negativo	1:16	No
105	Dama	Negativo	1:32	No
106	Cuco	Negativo	1:32	No
107	Chamito	Negativo	1:16	No
108	Tigre	Negativo	1:32	No
109	Cariño	Positivo	1:128	No
110	Morrocoya	Positivo	1:16	Si
111	Chinita	Positivo	1:32	Si
112	Nerón	Negativo	1:64	No
113	Grandulón	Negativo	No realizado	Si
114	Kaiser	Negativo	1:64	No
115	Chiquita	Negativo	1:64	No
116	Teresa	Negativo	1:32	No
117	Mona	Positivo	No reacciona	Si

118	Tommy	Positivo	1:8	Si
119	Chiche	Positivo	1:64	No
120	Zuringa	Positivo	1:16	No
121	Zuringa	Positivo	No realizado	No
122	Mocha	Positivo	No realizado	No
123	Teniente	Negativo	1:32	No
124	Calimán	Positivo	1:128	No
125	Laisa	Negativo	1:16	No
El Campín				
126	Chiquita	Positivo	1:32	No
127	Bacán	Negativo	1:32	No
128	Perrita	Negativo	1:8	No
129	Boby	Negativo	1:16	No
130	Cuqui	Negativo	1:64	No
131	Califá	Negativo	1:16	No
132	Chispa	Negativo	1:64	No
133	Laika	Negativo	1:16	No
134	Bronqui	Positivo	1:64	Si