

**DETECCIÓN DE *LEISHMANIA* SPP. (KINETOPLASTEA: TRYPANOSOMATIDAE)
EN FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) ASOCIADOS A LA APARICIÓN
DEL PRIMER CASO DE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LA VEREDA TORO, SAN
CAYETANO, BOLÍVAR.**

MAIRA ALEJANDRA ALEMÁN SANTOS

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2018**

**DETECCIÓN DE *LEISHMANIA* SPP. (KINETOPLASTEA: TRYPANOSOMATIDAE)
EN FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) ASOCIADOS A LA APARICIÓN
DEL PRIMER CASO DE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LA VEREDA TORO, SAN
CAYETANO, BOLÍVAR.**

MAIRA ALEJANDRA ALEMÁN SANTOS

Trabajo de grado como requisito para optar al título de pregrado en Biología

Director: EDUAR ELÍAS BEJARANO MARTÍNEZ., PhD. Med. Trop.

Codirector: ALVEIRO JOSÉ PÉREZ DORIA., MSc.

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2018**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Primer Jurado

Segundo Jurado

Sincelejo, 22 de mayo de 2018

DEDICATORIA

A Dios por sus bendiciones, por ser mi guía en todo momento, no dejarme desfallecer en este y cada uno de los proyectos que me he propuesto en la vida.

A mis padres Rosalba Santos Mendoza y Oscar Del Cristo Alemán Díaz, por sus enseñanzas y esfuerzos, son mi motor para seguir adelante todos los días.

A mis hermanos Oscar Alemán Y Ibeth Alemán por apoyarme en todo el proceso de mi carrera.

Maira Alejandra Alemán Santos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque sin él este logro no fuese posible.

A mis padres Rosalba Santos Mendoza y Oscar Alemán Díaz por el apoyo incondicional durante todo el transcurso de mi carrera.

A mis familiares por siempre estar ahí durante este proceso.

A mis amigas Wendy Zabala y Lina Martínez por sus consejos, apoyo desinteresado y por brindarme su amistad

A mi director Eduar Elías Bejarano por ser un gran guía a la hora de orientarme y por su confianza.

A mi co- director Alveiro Pérez-Doría por su apoyo, confianza y sus enseñanzas en todo este proceso de trabajo.

Al profesor Pedro Blanco, por abrirme las puertas del Grupo de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre.

A Luis Roberto Romero, Luis Estrada, Natalia Lastre, Jose Gabriel Vergara y Matilde Rivero por su disposición para brindarme su ayuda, orientación y una mano amiga.

Al Grupo Investigaciones Biomédicas por todo el apoyo brindado en el transcurso del trabajo.

“Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en este trabajo”

(Artículo 12, Resolución 02 de 2003).

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS	19
1.1. General:	19
1.2. Específicos:	19
2. MARCO TEÓRICO	20
2.1. Generalidades de la Leishmaniasis	20
2.2. Flebotomíneos	21
2.3. Agente etiológico	23
2.4. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	24
2.4.1.Ciclo de vida de las especies del género <i>Leishmania</i> en el insecto y el humano	24
2.5. Ciclos epidemiológicos de transmisión de <i>Leishmania</i>	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Área y tipo de estudio	27

3.2. Estimación de la abundancia relativa de las especies de flebotomíneos presentes en la vereda Toro, San Cayetano, Bolívar.....	29
3.2.1. Búsqueda entomológica.....	29
3.2.2. Identificación taxonómica de flebotomíneos por caracteres morfológicos	31
3.3. Detección de infección natural con especies del género <i>Leishmania</i> en flebotomíneos recolectados en la vereda Toro, San Cayetano, Bolívar	32
3.3.1. Extracción del ADN.....	32
3.4. Detección de <i>Leishmania</i> por reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	33
3.4.1. PCR de la región conservada del minicírculo.....	33
3.4.2. PCR semi-anidada del <i>Espaciador Transcrito Interno</i> (ITS 2).....	33
3.4.3. PCR-anidada con el gen citocromo b (Cyt b).....	35
3.5. Visualización del ADN por Electroforesis en gel de agarosa.....	37
3.6. Genotipificación de los parásitos que infectan a las poblaciones del género <i>Lutzomyia</i> mediante secuenciación y análisis filogenético de la región conservada del minicírculo y del <i>espaciador transcrito interno</i> (ITS 2).....	37
3.7. Cálculo de la frecuencia de infección	38
4. RESULTADOS.....	39
4.1. Estimación de la abundancia relativa de las especies de flebotomíneos presentes en la vereda Toro, San Cayetano, Bolívar	39
4.2. Detección de infección natural con parásitos del género <i>Leishmania</i> en flebotomíneos de la vereda Toro, San Cayetano, Bolívar	41

4.3. Genotipificación de los parásitos que infectan a las poblaciones del género <i>Lutzomyia</i> mediante secuenciación y análisis filogenético de la región conservada del minicírculo y del <i>espaciador transcrito interno</i> (ITS 2).....	42
5. DISCUSIÓN	45
6. CONCLUSIONES.....	50
7. RECOMENDACIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis: leishmaniasis cutánea (LC).....	21
Figura 2. Manifestaciones clínicas la leishmaniasis: leishmaniasis mucocutánea (LMC).....	21
Figura 3. Manifestaciones clínicas la leishmaniasis: leishmaniasis visceral (LV).....	21
Figura 4. Ciclo de transmisión de <i>Leishmania</i> spp.....	25
Figura 5. Área rural del corregimiento de San Cayetano, municipio de San Juan Nepomuceno, departamento de Bolívar, Colombia.....	28
Figura 6. Colocación de trampas en sitios de muestreo.....	30
Figura 7. Trampa de luz emitidas por diodos.....	30
Figura 8. Sacos espermáticos de hembras del género <i>Lutzomyia</i> capturadas en la vereda Toro del municipio de San Juan Nepomuceno.....	39
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados de la región conservada del minicírculo.....	41
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados de la segunda ronda del gen Citocromo b (Cyt b).....	42
Figura 11. Análisis filogenético de la región del minicírculo <i>Leishmania</i>	43
Figura 12. Análisis filogenético de la región (ITS 2).....	44

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Perfiles térmicos usados para cada marcador molecular.....	36
Tabla 2. Abundancia de especies de <i>Lutzomyia</i> por ambiente.....	40
Tabla 3. Distribución de hembras de flebotomíneos no alimentados por ambiente muestreado	40

RESUMEN

En la Costa Caribe Colombiana, la leishmaniasis visceral (LV) constituye un importante problema de Salud Pública, tradicionalmente los casos de esta enfermedad se restringían a municipios particulares del macrofoco de Los Montes de María, sin embargo, recientemente se han presentado nuevos brotes en áreas rurales que se consideraban libres de esta enfermedad. En tales escenarios, tanto los parásitos, como los reservorios y los insectos son desconocidos, lo que limita, el diseño y aplicación de medidas de control, en este contexto, el objetivo de este trabajo fue conocer las especies de flebotomíneos asociados a la aparición de un caso autóctono de LV que se presentó por primera vez en la vereda Toro, San Cayetano, Bolívar y detectar ADN de *Leishmania* spp. en estos insectos. El estudio se desarrolló en mayo del 2015, los flebotomíneos fueron capturados usando trampas de luz emitida por diodos (LED), las cuales fueron ubicadas y operadas entre las 18:00 y las 06:00 horas, éstas fueron ubicadas en ambientes peri y extradomésticos. Las hembras fueron determinadas taxonómicamente y las no alimentadas organizadas en grupos de hasta 20 individuos. La detección del ADN de los parásitos se realizó por PCR de la región conservada del minicírculo del kinetoplasto, del *Espaciador Transcrito Interno* (ITS 2) y para el gen mitocondrial Citocromo b (Cyt b), los productos obtenidos, fueron secuenciados y analizados en conjunto con cepas de referencia. En total se capturaron 2.178 flebotomíneos. La especie más abundante fue *Lu. evansi* (99.60%), seguida en orden descendente por *Lu. dubitans* (0.30%) y *Lu. trinidadensis* (0,1%). Con base en la región conservada del minicírculo, se encontró que *Lu. evansi* y *Lu. dubitans* presentaron una frecuencia mínima de infección con *Leishmania* del 2,71% (n: 29/1.070) y 25% (n: 1/4) respectivamente. En *Lu. evansi* se determinó que tres grupos presentaron infección con *Le. infantum* y con la PCR semi-anidada de la región del *Espaciador Transcrito Interno* (ITS 2), se encontró que *Lu. evansi* presentó una

frecuencia mínima de infección que corresponde a un 0,186% (n: 2/1.070), adicionalmente, se encontró que un grupo de esta especie presentó infección con *Le. braziliensis*. Se concluye que hembras de *Lu. evansi* y *Lu. dubitans* se infectan naturalmente con *Leishmania* spp. en la zona bajo estudio y que *Lu. evansi* se infecta con *Le. infantum* y *Le. braziliensis*, lo que sumado a sus antecedentes epidemiológicos como vector, su alta abundancia, amplia distribución, su capacidad de adaptación y sus hábitos alimenticios, sugieren que esta especie podría ser la responsable de la transmisión de estos parásitos en la zona y no se descarta la aparición de brotes cutáneos de la enfermedad.

Palabras claves: Leishmaniasis, *Lutzomyia evansi*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*, infección natural.

ABSTRACT

In the Colombian Caribbean Coast, visceral leishmaniasis (LV) is an important public health problem, traditionally the cases of this disease were restricted to particular municipalities of the macrofocus of Los Montes de María, however, recently there have been new outbreaks in areas rural who were considered free of this disease. In such scenarios, both parasites, reservoirs and insects are unknown, which limits, the design and application of control measures, in this context, the objective of this work was to know the phlebotomine species associated with the appearance of an autochthonous case of LV that was presented for the first time in the village Toro, San Cayetano, Bolívar and detected DNA of *Leishmania* spp. in these insects. The study was developed in May 2015, phlebotominees were captured using light traps emitted by diodes (LED), which were located and operated between 6:00 p.m. and 6:00 p.m., they were located in peri and extradomestic environments. The females were taxonomically determined and the non-females organized in groups of up to 20 individuals. The DNA detection of the parasites was performed by PCR of the conserved region of the minicircle of the kinetoplast, of the Internal Transcribed Spacer (ITS 2) and for the mitochondrial gene Cytochrome b (Cyt b), the products obtained were sequenced and analyzed in conjunction with reference strains. A total of 2,178 phlebotominees were captured. The most abundant species was *Lu. evansi* (99.60%), followed in descending order by *Lu. dubitans* (0.30%) and *Lu. trinidadensis* (0.1%). Based on the conserved region of the minicircle, it was found that *Lu. evansi* and *Lu. dubitans* presented a minimum frequency of infection with *Leishmania* of 2.71% (n: 29 / 1.070) and 25% (n: 1/4) respectively. In *Lu. evansi* it was determined that three groups presented infection with *Le. infantum* and with semi-nested PCR from the region of the Internal Transcribed Spacer (ITS 2), it was found that *Lu.*

evansi presented a minimum frequency of infection corresponding to 0.186% (n: 2 / 1.070), additionally, it was found that a group of this species presented infection with *Le. braziliensis*. It is concluded that females of *Lu. evansi* and *Lu. dubitans* are naturally infected with *Leishmania* spp. in the area under study and that *Lu. evansi* gets infected with *Le. infantum* and *Le. braziliensis*, which, added to its epidemiological background as a vector, its high abundance, wide distribution, its adaptability and its feeding habits, suggest that this species could be responsible for the transmission of these parasites in the area and the possibility of appearance of cutaneous outbreaks of the disease.

Key words: Leishmaniasis, *Lutzomyia evansi*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*, natural infection.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por parásitos protozoarios del género *Leishmania* (Desjeux, 1996). Esta parasitosis sigue siendo una de las enfermedades desatendidas en el mundo y afecta principalmente a la clase social más necesitada en los países en desarrollo (OMS, 2010). La enfermedad es prevalente en 98 países, distribuidos principalmente en zonas tropicales y subtropicales (Alvar J, 2012), cada año se registran entre setecientos mil y un millón de nuevos casos, pero solo una parte de las personas infectadas por este parásito padecen la enfermedad (OMS, 2017). En Colombia, la leishmaniasis es considerada un problema de Salud Pública y en los últimos años se han registrado nuevos focos de la enfermedad, así como la urbanización de los ciclos de transmisión en algunas regiones (MPS, 2005).

El parásito es transmitido a los vertebrados por la picadura de flebotómíneos hembras, principalmente del género *Phlebotomus* en Europa, Asia y África, y por especies del género *Lutzomyia* en América (Bates, 2007). Aproximadamente 500 especies de *Lutzomyia* se encuentran registradas en América, en Colombia están presentes 153 especies y trece de éstas se han encontrado infectadas naturalmente con *Leishmania* spp. (Bejarano & Estrada, 2016; Cárdenas, Pabón, Anaya, & Sandoval, 2005; Corredor et al., 1989; Ferro et al., 2011; Ferro et al., 1995; Flórez et al., 2006; Kreutzer RD, 1991; Morales, Corredor, Cáceres, Ibagos, & de Rodríguez, 1981; Moreno et al., 2015; Munoz-Mantilla, 1998; Santamaría, Ponce, Zipa, & Ferro, 2006; Seccombe, 1993; B. Travi et al., 1990; Bruno L. Travi et al., 1996; Bruno L Travi, Montoya, Solarte, Lozano, & Jaramillo, 1988; Trujillo et al., 2013; Vásquez-Trujillo et al., 2008; D. Young et al., 1987).

La leishmaniasis es una enfermedad epidemiológicamente compleja por la diversidad de parásitos, vectores y reservorios, adicionalmente, diferentes factores como las condiciones

socioeconómicas, climáticas, demográficas y las conductas humanas son determinantes de la aparición de casos. La leishmaniasis visceral suele afectar a poblaciones pobres y marginadas, afectando principalmente a localidades rurales y periurbanas (Boelaert et al., 2009).

En Colombia la LV representa un problema de Salud Pública que afecta principalmente a menores de 5 años de edad (C. Zambrano, Ayala, M., Fuya, O., Montenegro, C., Ayala, N., Rodríguez, J & et.al, 2015). Durante los años 2008 a 2016 se han notificado 211 casos confirmados; el 97,2 % proceden de los departamentos de Bolívar, Sucre, Córdoba, Huila, Tolima y Cundinamarca, con distribución en 33 municipios del país. El 68,7% de estos casos se concentraron en los municipios de, El Carmen de Bolívar, Ovejas, San Andrés de Sotavento, Tuchín, Neiva y Sincelejo (SIVIGILA, 2013, 2014, 2015, 2016,2017).

Tradicionalmente, la leishmaniasis se ha presentado en zonas rurales de la Costa Caribe, con continuos registros históricos de casos, sin embargo, en los últimos años hay presencia de focos de la enfermedad en localidades donde nunca había sido registrada esta patología, por ejemplo, en 2001, en el departamento de Sucre se registró un caso autóctono urbano de LV y desde entonces se han presentado casos esporádicos (E. E. Bejarano, S. Uribe, et al., 2001; Eduar Elías Bejarano, Uribe, Rojas, & Darío Vélez, 2002). Así mismo, a finales del 2015, en Cartagena, Bolívar, se confirmó la presencia de un caso de LV en una niña de un año de edad en el barrio Lo Amador, cerca al sector turístico de la ciudad (C. Zambrano, Fuya, P., et al, 2015). En esta región, la LV es una enfermedad endémica en áreas rurales (L. Cortés & Pereira, 2011; L. A. Cortés, 2006; P.-D. Cortés, et al, 2009; J Montoya-Lerma, 1996) y de ocurrencia esporádica en algunas ciudades y centros urbanos de la región.

En el departamento de Bolívar, en 2015, se presentaron 14 casos de LV, de estos el 93% (n: 13/14) se detectaron en la zona rural y urbana del municipio de El Carmen de Bolívar, mientras que el 7,0 % (n:1/14 casos) se registró en San Juan Nepomuceno, municipio donde antes no se registraba la enfermedad (SIVIGILA, 2015).

En la Costa Caribe del país, se destaca la importancia *Lutzomyia evansi* como vector del agente etiológico de la forma visceral (James Montoya-Lerma & Lane, 1996; Bruno L. Travi et al., 1996) y en los últimos años se ha empezado a generar evidencia de su papel como vector potencial de parásitos causantes de la forma cutánea de la enfermedad (A. Pérez-Doria, Romero, L., Martínez, M., Rivero, M., & Bejarano, E. E, 2015; Pérez–Doria et al., 2011; Romero Ricardo, 2015).

En la vereda Toro del corregimiento de San Cayetano, departamento de Bolívar, se registró por primera vez la ocurrencia de un caso autóctono de LV en un menor de 5 años de edad. El primer registro de un caso de LV en esta vereda evidencia la interacción del agente etiológico con sus vectores, reservorios y humanos residentes en la zona, lo que constituiría un riesgo para la población que posiblemente no había estado expuesta al contacto con estos parásitos. Estos hallazgos crean la necesidad de identificar la fauna flebotomínea presente, conocimiento fundamental para comprender la ecoepidemiología de la enfermedad en regiones donde esta aparece con carácter emergente; así mismo, este conocimiento debería servir como base para diseñar e implementar medidas de control vectorial por parte de las autoridades y organismos de salud. En este sentido, el presente estudio se enfocó en conocer la composición de especies de la fauna flebotomínea y en la búsqueda de infección natural con *Leishmania* spp. en los flebotomíneos asociados a este caso de LV.

1. OBJETIVOS

1.1. General:

Detectar infección natural con *Leishmania* spp. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) en flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) asociados a un caso de leishmaniasis visceral en la vereda Toro, San Cayetano, Bolívar.

1.2. Específicos:

- Estimar la abundancia relativa de las especies de flebotomíneos presentes en la vereda Toro, San Cayetano, Bolívar.
- Detectar infección natural con especies del género *Leishmania* en flebotomíneos recolectados en la vereda Toro, San Cayetano, Bolívar.
- Identificar molecularmente las especies de *Leishmania* que infectan de forma natural a los flebotomíneos recolectados en la vereda Toro, San Cayetano, Bolívar.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades de la Leishmaniasis

La leishmaniasis como grupo de enfermedades son consideradas como la segunda parasitosis más importante a nivel global, por su alta morbilidad y prevalencia anual, afectando a gran parte de la población en el mundo (Sánchez, 2004). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cada año se produce entre 50.000 y 90.000 nuevos casos de leishmaniasis visceral, además se estima que 350 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad.

La leishmaniasis es una zoonosis causada por protozoos flagelados del género *Leishmania*, un parásito intracelular obligado que infecta a humanos, mamíferos silvestres y domésticos (Assembly, 2007). Según las manifestaciones clínicas la enfermedad se clasifica como leishmaniasis cutánea (LC), mucocutánea (LMC) o visceral (LV). La forma cutánea se presenta con úlceras localizadas en el sitio de picadura (figura 1), la forma mucocutánea con destrucción e inflamación de los tejidos mucosos (figura 2) y la forma visceral con una infección visceral diseminada (figura 3) (Alvar et al., 2012).

La LV es una enfermedad grave, potencialmente fatal, que se presenta en forma epidémica, tanto en áreas rurales como urbanas (Fernandez, 2010), con una incidencia anual de 500.000 nuevos casos (OMS, 2017). En el año 2015, más del 90% de los nuevos casos notificados a la OMS se produjeron en siete países: Brasil, Etiopía, India, Kenya, Somalia, Sudán y Sudán del Sur (OMS, 2017), teniendo como agente etiológico a *Le. infantum* en el Nuevo Mundo y a *Le. donovani* y *Le. infantum* en el Viejo Mundo (OMS, 2010).



**Fig. 1. Leishmaniasis
cútanea
(LC)**



**Fig. 2. Leishmaniasis
mucocutánea
(LMC)**



**Fig. 3. Leishmaniasis
visceral
(LV)**

Fuente: extraído de OMS, OPS 2014

2.2. Flebotomíneos

Los flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) del género *Lutzomyia*, morfológicamente, se caracterizan por ser insectos pequeños, con poca capacidad de vuelo. Los adultos tienen un tamaño que oscila entre 3 y 5 mm, las hembras requieren de ingestas de sangre para realizar la ovoposición, mientras que los machos son fitófagos. Estos insectos presentan actividad crepuscular y nocturna. Su ciclo biológico es terrestre y está compuesto por los estados de huevo, larva, pupa y adulto, con una duración en promedio de 45 días (A. Young, 1992; D. G. Young, & Duncan, M. A. , 1994). Los parásitos del género *Leishmania*, son transmitidos a los mamíferos (incluido el humano), a partir de la picadura de una hembra flebotomínea infectada (Fernández, 2012).

En el mundo están descritas aproximadamente 1.000 especies de flebotomíneos, de las cuales 600 están en América. En Colombia están registradas 153 especies de flebotomíneos del género *Lutzomyia*. A la fecha se ha detectado infección natural con *Leishmania* en trece especies, que

incluyen: *Lu. longipalpis* y *Lu. evansi* con *Le. infantum*; *Lu. trapidoi*, *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis* y *Lu. yuilli* con *Le. panamensis*; *Lu. spinicrassa* con *Le. braziliensis*; *Lu. umbratilis* y *Lu. longiflocosa* con *Le. guyanensis*; *Lu. hartmanni* con *Le. colombiensis*; *Lu. trapidoi* con el complejo *Le. braziliensis*; *Lu. flaviscutellata* y *Lu. antunesi* con *Leishmania* spp (Cárdenas et al., 2005; Cochero & Blanco, 2003; Ferro et al., 1995; Flórez et al., 2006; Kreutzer RD, 1991; Morales et al., 1981; Moreno et al., 2015; Munoz-Mantilla, 1998; Santamaría et al., 2006; B. Travi et al., 1990; Bruno L. Travi et al., 1996; Bruno L Travi et al., 1988; Trujillo et al., 2013; Vásquez-Trujillo et al., 2008; D. G. Young & Lawyer, 1987).

En la región Caribe, la cual está tradicionalmente representada por los departamentos de Córdoba, Sucre, Bolívar, Atlántico, Magdalena, La Guajira y Cesar, se han encontrado 33 especies *Lu. abonnenci*, *Lu. atroclavata*, *Lu. cayennensis cayennensis*, *Lu. dubitans*, *Lu. evansi*, *Lu. gomezi*, *Lu. micropyga*, *Lu. panamensis*, *Lu. pilosa*, *Lu. punctigeniculata*, *Lu. rangeliana*, *Lu. serrana*, *Lu. shannoni*, *Lu. trinidadensis*, *Lu. venezuelensis*, *Lu. vespertilionis*, *Lu. walkeri*, *Lu. ylephiletor*, *Lu. yuilli*, *Lu. bicolor*, *Lu. camposi*, *Lu. spinicrassa*, *Lu. longipalpis*, *Lu. carpenteri*, *Lu. ovallesi*, *Lu. migonei*, *Lu. gorbitzi*, *Lu. caprina*, *Lu. antunesi*, *Lu. columbiana*, *Lu. disiuncta*, *Lu. dysponeta* y *Lu. lichyi*, de las cuales 19 están registradas en el departamento de Bolívar (Bejarano & Estrada, 2016).

La capacidad vectorial del flebotomíneo para transmitir las formas infectivas de los parásitos del género de *Leishmania* depende de la abundancia del flebotomíneo, la tasa de supervivencia del flebotomíneo hembra, la duración de su ciclo de vida y la frecuencia media de picadura del insecto sobre un hospedador vertebrado (Dye, 1990).

De los flebotomíneos del género *Lutzomyia*, 56 especies se catalogan como vectores comprobados o sospechosos de *Leishmania* spp.(MAROLI, 2013). En el país, solo el 6.5% de las

especies de *Lutzomyia* han sido reconocido como vector de especies plenamente identificadas de *Leishmania* (E. E Bejarano, 2015). Es así como tenemos que estudios en la Costa Atlántica Colombiana, reconocen el papel que desempeña la especie *Lu. evansi* en la transmisión de *Le. infantum*, agente causal de la leishmaniasis visceral (Cohero & Blanco, 2003; James Montoya-Lerma & Lane, 1996; B. Travi et al., 1990). Es importante resaltar que *Lu. evansi*, es la especie predominante en el área y participa en el ciclo de la forma visceral de la enfermedad.

En la actualidad, el método más usado para detectar e identificar los parásitos presentes en flebotomíneos es la caracterización de regiones del ADN mitocondrial o nuclear del parásito mediante técnicas como la PCR-secuenciación (Gomez, Kato, & Hashiguchi, 2014). Entre los marcadores moleculares empleados con esta finalidad, se encuentran el gen citocromo b (Asato et al., 2009; Gomez et al., 2014), el *espaciador transcrito interno* del ADN ribosomal (Quiroga et al., 2017; Rêgo et al., 2015), el gen de la proteína de choque térmico de 70 kDa (Fraga, Montalvo, De Doncker, Dujardin, & Van der Auwera, 2010; Pereira, Teles, Marialva, Pessoa, & Medeiros, 2015) y la región conservada del minicírculo del kinetoplasto en el género *Leishmania* (Lastre-Meza, 2015; A. Pérez-Doria, 2011).

2.3. Agente etiológico

El género *Leishmania* está integrado por parásitos tripanosomatídeos (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) que afectan a los vertebrados y que son transmitidos por la picadura de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) (Brilhante et al., 2015). Hay 53 especies descritas de *Leishmania* en el mundo y alrededor de veinte presentan importancia médica (Akhoundi et al., 2016).

Según su desarrollo en el intestino del insecto vector, taxonómicamente, los parásitos han sido agrupados en dos subgéneros: *Le. (Leishmania)* descrito por (Safjanova, 1982) que agrupa las

especies con desarrollo suprapilórico de los flagelados y el subgénero *Le. (Viannia)* descrito por (Lainson & Shaw, 1987), que agrupa a las especies de multiplicación peripilórica. Colombia es uno de los tres países con mayor número de especies del género *Leishmania* (siete especies) patógenas para el humano, donde el 0.3% de los casos son de LV por *Le. infantum*, el 99.3% de LC y 0,4% de LMC; estas manifestaciones son asociadas a *Le. panamensis* y *Le. braziliensis* (Ramirez et al., 2016).

2.4. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

2.4.1. Ciclo de vida de las especies del género *Leishmania* en el en el insecto y el humano

En el ciclo de vida del parásito, los promastigotes metacíclicos, una vez en la probóscide del flebotomíneo hembra son introducidos por la picadura en un hospedador vertebrado durante la ingesta de sangre, los parásitos son fagocitados por los macrófagos, células de Langerhans y activan el complemento. Aunque muchos promastigotes son destruidos por células del sistema inmune, en los fagolisosomas (vacuola parasitófora) pierden el flagelo y se transforman en amastigotes, multiplicándose por fisión binaria. Las células infectadas se rompen finalmente y los amastigotes se diseminan, de acuerdo a factores del parásito y del hospedero. Cuando flebotomíneos libres de infección se alimentan de hospederos infectados, ingieren las células con amastigotes, los cuales sufren cambios bioquímicos y morfológicos en el intestino medio del insecto, se multiplican y finalmente migran a la probóscide como promastigotes metacíclicos, altamente infectantes, ocurriendo de nuevo el ciclo (Uribarren, 2011).

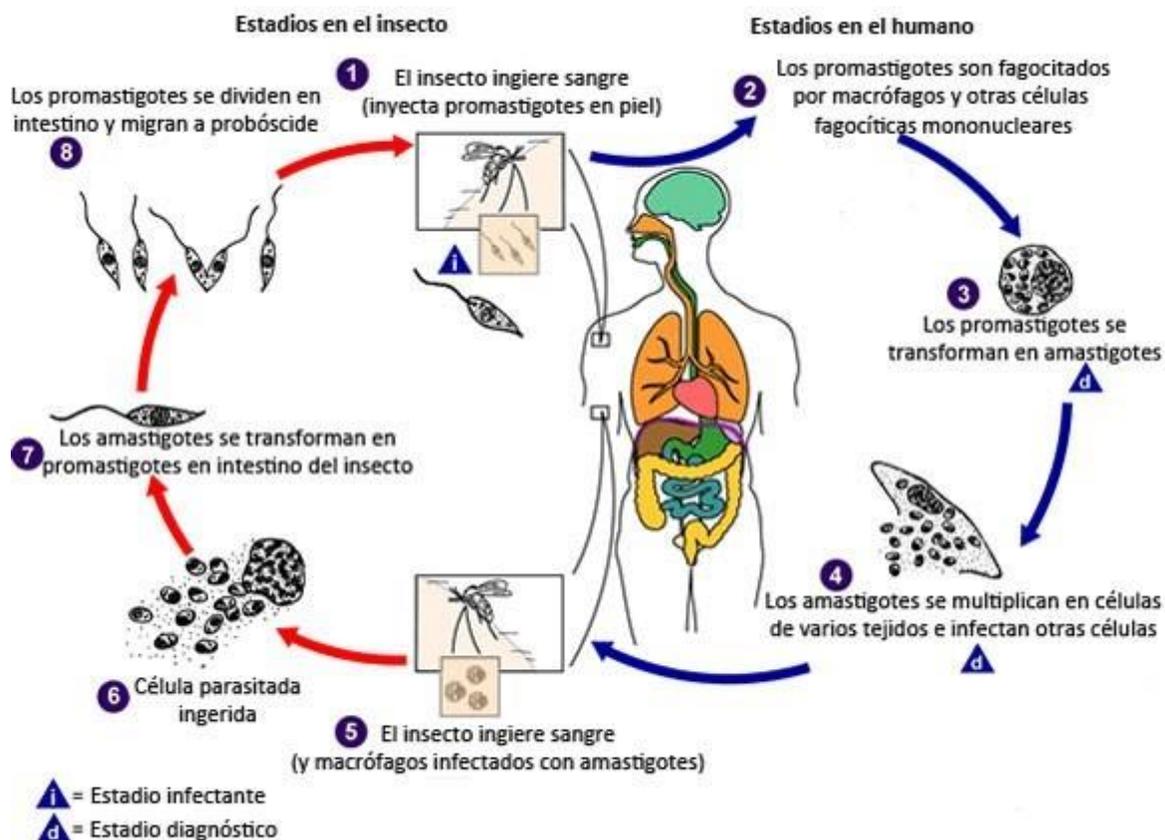


Figura 4. Ciclo de transmisión de *Leishmania* spp.

Fuente: extraído de <http://www.cdc.gov/dpdx/>

2.5. Ciclos epidemiológicos de transmisión de *Leishmania*

En la Costa Caribe se han descrito tres escenarios epidemiológicos, dos de carácter rural y uno urbano, de transmisión de *Leishmania* spp. al humano (Eduar Elías Bejarano et al., 2002; Lambrano Cruz, Manjarrez Pinzón, & Bejarano Martínez, 2012). Uno de los escenarios rurales comprende, básicamente, a la población masculina, que, en razón a su trabajo, ingresa al hábitat del vector y es ahí donde adquiere la infección, el otro escenario rural, es de carácter doméstico, este afecta a la familia en general, sin distinción de edad o sexo, puesto que el contacto con el insecto vector se produce cerca o dentro de las viviendas. Adicionalmente, hace cierto tiempo se describe un tercer escenario por casos de LC y LV, que ocurren, esporádicamente, en áreas urbanas

y periurbanas de los departamentos de Sucre y Bolívar (Eduar Elías Bejarano et al., 2002; L. A. Cortés & Fernández, 2008).

Los registros de los casos de leishmaniasis en Colombia muestran que el número de casos bajó en los últimos cinco años y se ha observado una variación de los patrones ecoepidemiológicos clásicos de transmisión, puesto que algunas especies de insectos vectores ha mostrado aumento tanto en su distribución espacial como en su hábitat (Ferro et al., 2015).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área y tipo de estudio

La investigación fue desarrollada en la zona rural de la vereda Toro del corregimiento de San Cayetano del departamento de Bolívar, ubicado al noroeste del municipio de San Juan Nepomuceno. Esta vereda fue escogida para el estudio porque allí se registró por primera vez la ocurrencia de un caso autóctono de LV en un menor de 5 años de edad. Este municipio tiene una población total de 32.514 habitantes según datos del censo (DANE, 2005), de los cuales 8.787 viven en la zona rural. La principal actividad económica municipal es la ganadería y la agricultura. Ecológicamente, el municipio se clasifica dentro de la zona de vida bosque seco tropical (bs-T) según Holdrige, 1967, con temperatura media anual de 27,7 °C, humedad relativa superior al 80%, precipitación de 1400 mm y una altura de 1,67 M.S.N.M (Sitio oficial de San Juan Nepomuceno en Bolívar, 2012). Las lluvias en la zona tienen un régimen estacional bimodal (Arango, 2012.), el mes de mayo, que corresponde a la época de estudio, conforma el primer periodo lluvioso (Sitio oficial de San Juan Nepomuceno en Bolívar, 2012).

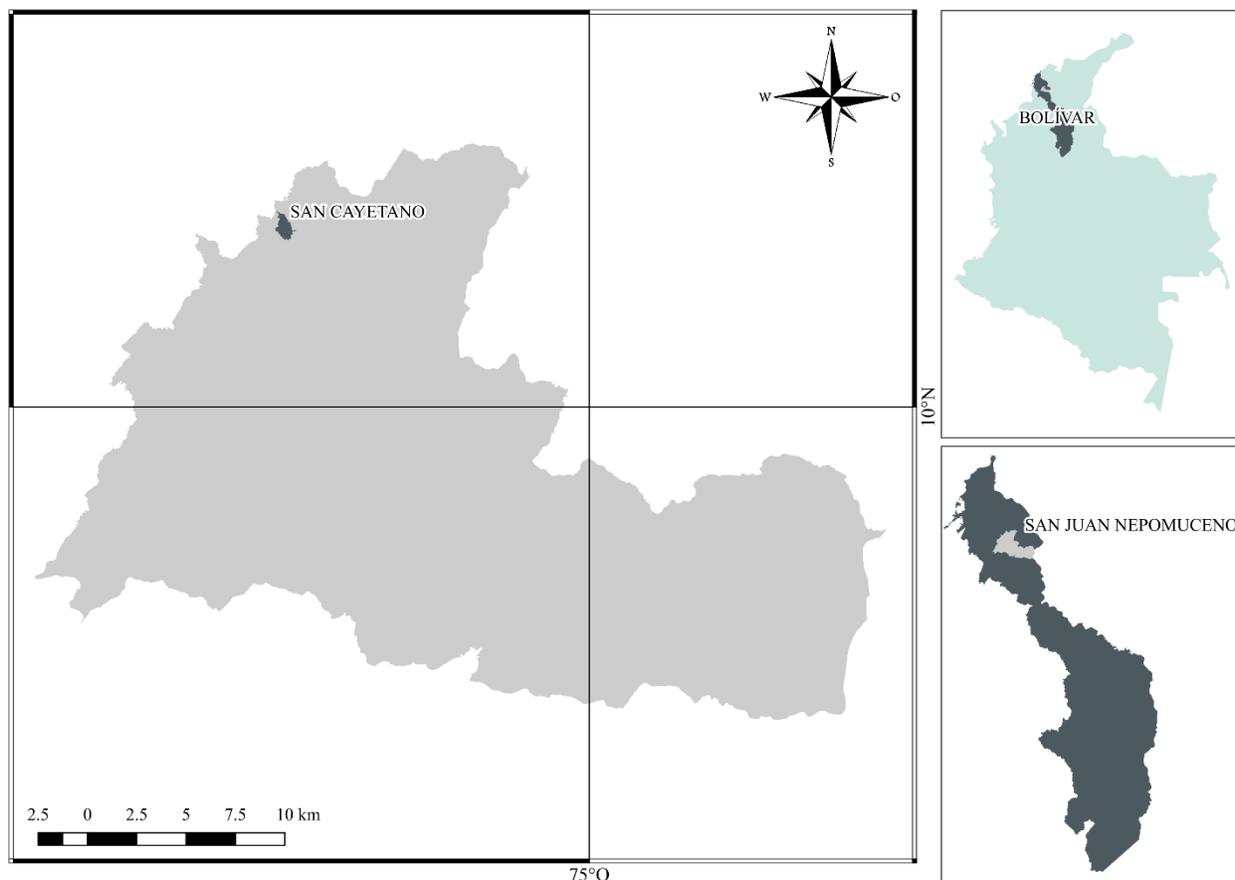


Figura 5. Área rural del corregimiento de San Cayetano, municipio de San Juan Nepomuceno, departamento de Bolívar, Colombia. Fuente: QGIS v. 2.18.14 para macOS Sierra (QGIS Development Team©, 2016).

En general, las viviendas de la vereda Toro del corregimiento de San Cayetano son de tipo artesanal, presentan características similares como techo de zinc, paredes de madera, piso de tierra, presencia de animales domésticos y abundante vegetación en el entorno.

Entre los vertebrados que se observaron durante la captura de los insectos estuvieron animales domésticos como *Canis familiaris* (perro), *Felis catus* (gato), *Gallus gallus domesticus* (gallina), *Sus scrofa* (cerdo), *Equus asinus* (burro) y *Bos taurus* (vaca); y silvestres como *Didelphis marsupialis* (zarigüeya) y *Dasypus novemcinctus* (armadillo).

La vegetación del peri y extradomicilio estuvo compuesta principalmente por *Mangifera indica* (mango), *Gliricidia sepium* (mata ratón), *Arecaceae* (palma), *Crescentia cujete* (totumo), *Annona purpurea* (Guanacón), *Tabebuia rosea* (roble), *Melicoccus bijugatus* (mamon), *Bougainvillea* sp. (trinitaria rellena), *Lippia alba* (salvia morada), *Tamarindus indica* (tamarindo), *Enterolobium cyclocarpum* (orejero), *Ixora coccinea* (coralito), *Psidium guajava* (guayaba), *Anacardium excelsum* (caracolí) *Albizia carbonaria* (guacamayo) y *Cocos nucifera* (coco).

Desde el punto de vista estadístico, el estudio se puede catalogar como transversal descriptivo.

3.2. Estimación de la abundancia relativa de las especies de flebotomíneos presentes en la vereda Toro, San Cayetano, Bolívar.

3.2.1. Búsqueda entomológica

Los flebotomíneos fueron recolectados en las semanas subsiguientes a la notificación del primer caso de LV en la vereda Toro. La captura de los insectos se realizó con trampas de luz emitida por diodos (Castillo Arroyo, Bejarano, & Pérez-Doria, 2011), las cuales fueron instaladas en cuatro sitios: relicto de bosque, corral de cerdos, corral de bovinos y área usada para el pastoreo. Las cuatro trampas fueron operadas entre las 18:00 y las 06:00 horas del 5 al 6 de mayo del 2015, para un esfuerzo de muestreo de 12 horas/trampa.

Como peridomicilio se consideró una distancia hasta 100 metros de la vivienda y se incluyeron dos sitios de reposo de animales domésticos en este ambiente: corral de cerdos y corral de bovinos. Como extradomicilio se catalogó una distancia mayor de 100 metros en la cual se encontraba un relicto de bosque y área de pastoreo.



Figura 6. Instalación de trampas en sitios de muestreo.
Fuente: Maira Alemán



Figura 7. Trampa de luz emitida por diodos.
Fuente: Maira Alemán

Los individuos colectados se depositaron en recipientes plásticos, rotulados con fecha y el sitio de captura, para su transporte hasta el Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre.

3.2.2. Identificación taxonómica de flebotomíneos por caracteres morfológicos

La identificación taxonómica de las especies de flebotomíneos recolectados se realizó analizando las estructuras anatómicas (cabeza, ala, genitales internos y externos), para este propósito los flebotomíneos fueron separados macroscópicamente del resto del material biológico que no pertenecía al grupo de interés. Luego se realizó un corte en los tres últimos segmentos abdominales, los cuales fueron aclarados en una mezcla de lactofenol (ácido láctico y fenol) en proporción 1:1(volumen/volumen). Estas estructuras se montaron temporalmente en láminas y se analizaron bajo el microscopio.

La determinación de especie de los flebotomíneos se realizó empleando las claves taxonómicas descritas por Young y Duncan, 1994 (D. G. Young, & Duncan, M. A. , 1994) y Galati, 2015 (Galati, 2015). En la determinación taxonómica se adoptó el esquema tradicional de tres géneros *Lutzomyia*, *Brumptomyia* França y Parrot, 1921 y *Warileya* Hertig, 1948, según lo estipulado en Young y Duncan (1994). Para hacer las pruebas de detección del ADN de los parásitos del género *Leishmania*, los flebotomíneos de la misma especie fueron organizados en grupos de 1 a 20 individuos, teniendo en cuenta el sitio de captura.

De los 2.178 flebotomíneos recolectados, 1.101 se encontraron con restos de sangre en el tracto digestivo, por tanto, en estas hembras no se buscó infección con *Leishmania* puesto que existe polémica en caso de muestras positivas, porque no se puede diferenciar entre una hembra recién ingurgitada con sangre infectada y una hembra previamente infectada, con base en este criterio, se seleccionaron los 1.077 flebotomíneos donde no se observó la presencia de sangre para hacer la búsqueda de los parásitos.

3.3.Detección de infección natural con especies del género *Leishmania* en flebotomíneos recolectados en la vereda Toro, San Cayetano, Bolívar

3.3.1. Extracción del ADN

A partir del cuerpo de cada espécimen del género *Lutzomyia* se realizó una extracción empleando el protocolo de extracción de ADN de altas concentraciones de sales descrito por Collins *et al*, 1987 (Collins F., 1987), con ajustes realizados en trabajos previos (Pérez-Doria A., 2008) que incluyen la maceración mecánica del insecto con un micropistilo en 100 µl del búfer de lisis(0.08 NaCl, 0.16 M Sacarosa, 0.06 M EDTA, 0.5% SDS, 0.1 M Tris-HCL a pH de 7.5), luego una degradación de proteínas con proteinasa K a 65°C por dos horas, posteriormente se inactivó la proteinasa K a 95°C por 5 minutos, seguido de la adición de 14 µl de acetato de potasio 8M y se incubó a -4°C por 30 minutos. Después se realizó una centrifugación a 12.000 rpm/20min/4°C, luego se adicionó un volumen de isopropanol y se almacenó -20°C toda la noche para la precipitación del ADN. Al sobrenadante obtenido del anterior paso se le realizó un lavado con 200 µl etanol al 70% y etanol absoluto, entre cada lavado se realizó una centrifugación a 12.000rpm/5min/4°C.

Posteriormente, el ADN extraído fue secado a temperatura ambiente de 15 a 30 minutos y resuspendido en agua ultrapura. Las muestras obtenidas fueron depositadas y rotuladas en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, se cuantificaron en un espectrofotómetro de pedestal determinándose la concentración y pureza del ADN extraído, finalmente fueron conservados a -20°C hasta su utilización.

3.4. Detección de *Leishmania* por reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.4.1. PCR de la región conservada del minicírculo.

Con el fin de detectar la presencia de ADN del parásito en los flebotomíneos se realizó una PCR convencional, en ella se utilizaron los cebadores 13A: 5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3' y 13B: 5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3', descritos por (Rodgers, Popper, & Wirth, 1990), que delimitan un fragmento de ~ 120 pb de la región conservada del minicírculo del kinetoplasto en el género *Leishmania*. Este segmento es útil como marcador molecular porque existen aproximadamente 10.000 a 20.000 copias de los minicírculos del ADNk en un solo parásito lo que ofrece una alta sensibilidad, adicionalmente, los cebadores delimitan una región que es conservada en el género *Leishmania*. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25 µl y se usaron las siguientes condiciones: Búfer de PCR 1X, 1,5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada cebador y 1.25 unidades de Platinum® *Taq* DNA Polymerase. Como control positivo se utilizó ADN de una cepa de referencia de *Leishmania* (*Le. infantum* MHOM/CO/2013/77) y como control negativo se usó agua ultrapura. En la Tabla 1 se describe el perfil térmico empleado. Los productos de la PCR se secuenciaron de forma automatizada, utilizando los mismos oligonucleótidos de la PCR.

3.4.2. PCR semi-anidada del *Espaciador Transcrito Interno* (ITS).

Adicionalmente, en la búsqueda de infección con parásitos tripanosomatídeos se usó como blanco, una región el ADN ribosomal, que ha sido útil para la genotipificación de tripanosomatídeos en flebotomíneos (A. Pérez-Doria, 2011; Quiroga et al., 2017; Rêgo et al., 2015), estos genes se encuentran presentes en múltiples copias hay entre 150 y 200 copias de estos genes de ARNr en el genoma de *Leishmania* y sus patrones de polimorfismo permiten la tipificación de especies como ha sido demostrado en estudios previos (Cupolillo, Grimaldi Jr,

Momen, & Beverley, 1995; Mauricio, Stothard, & Miles, 2004; Odiwuor et al., 2011; Schönián et al., 2001). Con este propósito se realizó una PCR convencional semi-anidada, en la primera ronda se amplificó la región del espaciador transcrito interno (ITS), empleando los cebadores LITSV 5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3' y LITSR 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3', que flanquean una secuencia de longitud 1088 pb (El Tai, Osman, El Fari, Presber, & Schönián, 2000). Como no se obtuvo el fragmento de interés, se realizó una segunda ronda de amplificación tipo PCR TOUCHDOWN, empezando con 94°C para la desnaturalización, constó de 10 ciclos con una temperatura inicial de alineamiento de 61°C, disminuyendo 1°C cada ciclo; seguido de 35 ciclos con una temperatura de alineamiento estable a 51°C y finalizando con una temperatura de extensión de 72°C con los cebadores LITSV 5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC-3' y L5.8SR 5'-AAGTGCGATAAGTGGTA-3', los cuales delimitan un fragmento de 750 pb (de Almeida et al., 2011; El Tai et al., 2000). Ambas reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl, para la mezcla de PCR se utilizaron 3 µl del ADN extraído originalmente o una dilución (2/100) de los productos de PCR de la primera ronda, se usó Búfer de PCR a una concentración final de 1X, 1,5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada cebador y una unidad de Platinum® *Taq* DNA Polymerase. En la Tabla 1 se describe el perfil térmico empleado. Se incluyó el control positivo del producto de PCR de la primera ronda a partir de cepa de referencia de *Le. guyanensis*. Los productos de la PCR fueron purificados con base al protocolo de purificación descrito por (Watanabe, 1999) con algunas modificaciones posteriormente los productos obtenidos se mandaron a secuenciar de forma automatizada en la compañía Macrogen, utilizando los mismos oligonucleótidos de la PCR final.

3.4.3. PCR-anidada con el gen citocromo b (Cyt b).

Como alternativa en caso de que no se lograra la identificación de especie con base en los marcadores descritos anteriormente se amplificó el gen citocromo b (Cyt b) se realizó una PCR anidada, en la primera ronda se usaron los cebadores LCBF1 5'GGTGTAGGTTTTAGTYTAGG3' y LCBR2M 5'ACAATAAACAATCATAATATRCAATT3', que flanquean un segmento de 866 pb en especies del género *Leishmania* (Luyo-Acero et al., 2004). En la segunda ronda de amplificación se usaron los cebadores CB-Cytb-F 5'AAGTGGTGTGTGYTTAGCRTG-3' y CB-Cytb-B 5'-GGSACTGCTTTWARRAAGCC-3' descritos (Schmid & Tognazzo, 2010), que delimitan un segmento de 729 pb del mismo gen. La PCR se desarrolló en 25-50 µl de volumen que contenían Búfer de PCR 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP, 0,4 µM de cada cebador, 1,25-2,5 unidades Platinum® *Taq* DNA Polymerase y se sembraron 3-6 µl del ADN extraído, mientras que en la PCR anidada se sembró 1 µl del producto de PCR de la primera ronda, que previamente fue diluido 1/100. En la Tabla 1 se describe el perfil térmico empleado. Como control positivo se empleó ADN de *Le. infantum* (MHOM/CO/2013/77) y como control negativo se empleó ADN de machos de *Lutzomyia*.

Para que la prueba de detección de infección natural con especies del género *Leishmania* en los flebotomíneos se considerara positiva, el tamaño de los productos debía corresponder: la región conservada del minicírculo del kinetoplasto de 120 pb, 750pb ADN ribosomal y 729 pb del gen citocromo b. Este tamaño se determinó con la ayuda del marcador de peso molecular de 100 pb (Promega™) al ser separados en gel de agarosa como se describe posteriormente en el apartado correspondiente.

Tabla 1. Perfiles térmicos usados para cada marcador molecular.

MARCADOR	Etapa 1	Etapa 2			Etapa 3	Etapa 4
	Activación de la enzima	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final	Infinito
Región conservada del ADNk	95°C	95°C	55°C	72°C	72°C	12°C
	2 min	20 seg	40 seg	6 seg	5 min	For ever
	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo	
ITS	94°C	95°C	49.5°C	72°C	72°C	26°C
	2 min	20 seg	40 seg	65.3 seg	5 min	∞
	1 ciclo	40 ciclos			1 ciclo	
ITS 2 Semianida	94°C	95°C	61.0°C	72°C	72°C	26°C
	2 min	20 seg	15 seg	45 seg	5 min	∞
	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo	
CYB-1	95°C	95°C	51°C	72°C	72°C	12°C
	2 min	20 seg	40 seg	45 seg	5 min	For ever
	1 ciclo	40 ciclos			1 ciclo	
CYB-2	95°C	95°C	51°C	72°C	72°C	12°C
	2 min	20 seg	40 seg	45 seg	5 min	For ever
	1 ciclo	40 ciclos			1 ciclo	

Notas. Abreviaturas: Región conservada del ADNk (segmento de 120 pb), amplificando los cebadores 13A y 13B; ITS: región espaciadora transcrita interna (segmento de 1088pb), amplificado con los cebadores LITSR y LITSV; ITS semianidada: región espaciadora transcrita interna (segmento de 750 pb), amplificado con los cebadores LITSV y L5-8SR; CYB-1: gen Citocromo b (segmento de 866 pb), amplificado con los cebadores LCBF1 y LCBR2M; CYB-2: gen Citocromo b (segmento de 729 pb), amplificado con los cebadores CB-Cytb-F y CB-Cytb-B.

3.5. Visualización del ADN por Electroforesis en gel de agarosa

Los productos amplificados por PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1% por 45 minutos a 90 voltios, se tomaron 4 µl del producto de PCR y se mezclaron con 2 µl de búfer de carga, en la electroforesis se usó el búfer TBE (Tris base, Ácido Bórico, EDTA) a una concentración 0.5X. El ADN fue teñido con GelStar® y visualizados por exposición a luz ultravioleta en el transiluminador en un foto-documentador QUANTUM-ST4 (Vilber Lourmat). El tamaño de los amplificados obtenidos se determinó con ayuda de un marcador de peso molecular de 100bp (Promega™).

3.6. Genotipificación de los parásitos que infectan a las poblaciones del género *Lutzomyia* mediante secuenciación y análisis filogenético de la región conservada del minicírculo y del *espaciador transcrito interno* (ITS 2).

Los amplicones de cada fragmento de interés (región conservada del minicírculo e ITS 2) fueron secuenciados en ambos sentidos de la cadena de nucleótidos empleando los mismos cebadores de la reacción original, este procedimiento fue realizado con el sistema de electroforesis capilar ABI 3730 y fue contratado en la compañía MacroGen Inc. En la reacción de secuenciación se usaron los cebadores descritos en la PCR original, en el caso de gen ribosomal, se usaron los cebadores empleados en la segunda ronda. Los electroforegramas obtenidos fueron ensamblados y editados automáticamente con el programa Geneious® Versión 9 (Kearse et al., 2012), posteriormente fueron revisados de forma manual y se realizó la verificación de cada sitio polimórfico para obtener una secuencia consenso por cada muestra. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias depositadas en GenBank mediante el programa Blast (Basic Local Alignment Search

Tool)(Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990), después se descargaron 25 secuencias de cepas de referencia del género *Leishmania*, las cuales se alinearon con las secuencias obtenidas durante el estudio. El alineamiento se realizó empleando el método de refinamiento iterativo (Iterative Refinement Methods) con ayuda del programa MAFFT (Multiple Sequence Alignment Software, versión 7)(Katoh & Standley, 2013). Posteriormente se determinó el modelo de sustitución que mejor explica el patrón de polimorfismo observado en las secuencias y finalmente se realizaron las reconstrucciones filogenéticas con el método de máxima verosimilitud con el programa PhyML(Guindon et al., 2010), estos análisis fueron realizados el programa Geneious.

3.7.Cálculo de la frecuencia de infección

Para analizar los datos de frecuencia de infección, se estimó la frecuencia mínima de infección, asumiendo que por cada grupo hay al menos un insecto positivo, por lo tanto, se tomó este número como número de hembras de flebotomíneos infectados dentro del total de la población.

4. RESULTADOS

4.1. Estimación de la abundancia relativa de las especies de flebotomíneos presentes en la vereda Toro, San Cayetano, Bolívar.

En total, se recolectaron 2.178 hembras del género *Lutzomyia* en la vereda Toro. La determinación de especie por taxonomía clásica arrojó la presencia de tres taxones del género *Lutzomyia* que fueron *Lu. evansi*, *Lu. dubitans* y *Lu. trinidadensis*. Entre éstas *Lu. evansi* fue la especie más abundante con el 99,60% (n= 2.169/2.178), seguida de *Lu. dubitans* 0,30% (n= 6/2.178) y *Lu. trinidadensis* 0,1% (n= 3/2.178). La mayor abundancia de flebotomíneos se encontró en el área usada para el pastoreo de ganado vacuno. De los 2.178 flebotomíneos recolectados, 1.101 se encontraron alimentados con sangre y en 1.077 no se observó la presencia de sangre.

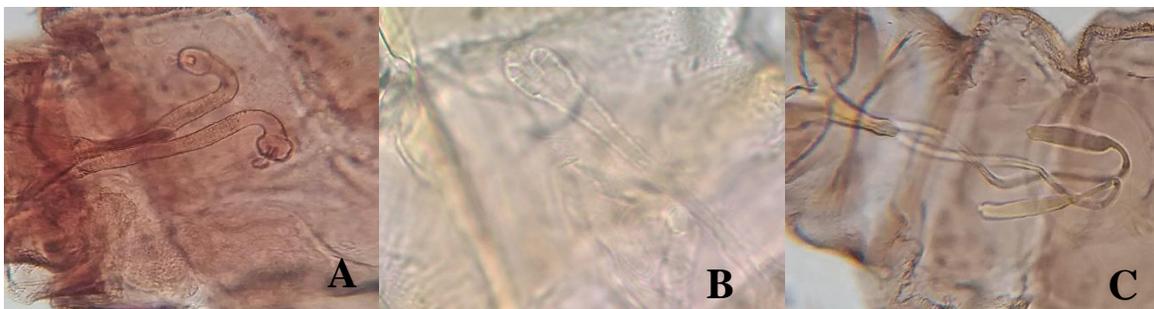


Figura 8. Sacos espermáticos de hembras del género *Lutzomyia* capturadas en la vereda Toro del municipio de San Juan Nepomuceno. A) *P. Lu. dubitans*, B) *Lu. evansi*, C) *Lu. trinidadensis*.

Fuente: Maira Alemán

Tabla 2. Abundancia de especies de *Lutzomyia* por ambiente.

	Peridomicilio		Extradomicilio		
Especie de flebotomíneo	Corral de cerdos	Corral de bovinos	Área de pastoreo	Relicto de bosque	Total
<i>Lu. evansi</i>	385	464	1.163	157	2.169
<i>Lu. dubitans</i>	2	2	1	1	6
<i>Lu. trinidadensis</i>	1	1	1	0	3
Total	388	467	1.165	158	2.178

Tabla 3. Distribución de hembras de flebotomíneos no alimentados por ambiente muestreado.

<i>Lutzomyia</i>	Corral de cerdos	Corral de bovinos	Área de pastoreo	Relicto de bosque
Estado alimenticio	(9%)	(33%)	(64%)	(58%)
<i>Lu. evansi</i>	33	149	740	148
<i>Lu. dubitans</i>	0	2	1	1
<i>Lu. trinidadensis</i>	1	1	1	0
Total	34	152	742	149
NA =No alimentadas				

4.2. Detección de infección natural con parásitos del género *Leishmania* en flebotomíneos de la vereda Toro, San Cayetano, Bolívar.

Las 1.077 hembras no alimentadas del género *Lutzomyia* que fueron organizadas en 61 grupos (de 1 a 20 individuos de la misma especie). Mediante la PCR de la región conservada del minicírculo se amplificó el fragmento de 120 pares de bases en 29 grupos de insectos de *Lu. evansi* y un individuo de *Lu. dubitans* (Figura 9), los cuales fueron capturados en el relicto de bosque y en el área de pastoreo (extradomicilio). En el que se encontró que *Lu. evansi* y *Lu. dubitans* presentaron una frecuencia mínima de infección con *Leishmania* del 2,71% (n: 29/1.070) y 25% (n: 1/4). Adicionalmente, con la PCR semi-anidada de ITS 2, solo se amplificó el fragmento de 750 pares de bases en 2 grupos de insectos de *Lu. evansi* que habían sido capturados en el área de pastoreo (extradomicilio). Con este marcador, la frecuencia mínima de infección con *Leishmania* que se encontró en *Lu. evansi* fue del 0,186% (n: 2/1.070). Aunque los 61 grupos también fueron evaluados por PCR anidada del gen citocromo b (Cyt b) no se amplificó el fragmento esperado en las muestras procesadas (Figura 10).



Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los cebadores 13A y 13B. Carriles **1:** M. Marcador de peso molecular (100 pb); **2-12:** Grupo de hembras del género *Lutzomyia* negativas y positivas para *Leishmania*; **13:** C+. Control positivo, ADN de *Le. infantum*; **14:** C-. Control negativo. Fuente: Maira Alemán

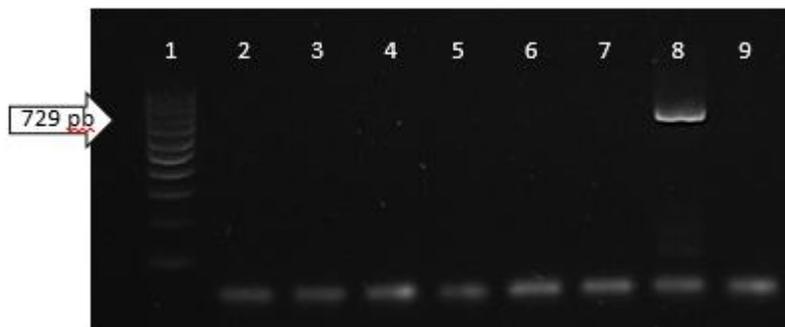


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la segunda ronda de amplificación con los cebadores CB-Cytb-F y CB-Cytb-B. Carriles **1**: M. Marcador de peso molecular (100 pb); **2-7**: Grupo de hembras del género *Lutzomyia* negativas para *Leishmania*; **8**: C+. Control positivo, ADN de *Le. infantum*; **9**: C-. Control negativo.

Fuente: Maira Alemán

4.3. Genotipificación de los parásitos que infectan a las poblaciones del género *Lutzomyia* mediante secuenciación y análisis filogenético de la región conservada del minicírculo y del espaciador transcrito interno (ITS 2).

Al analizar la calidad e intensidad de las bandas del tamaño esperado en los 30 grupos de hembras del género *Lutzomyia* en los que se consiguió amplificar la región conservada del minicírculo se encontró que 22 muestras exhibieron bandas muy tenues, razón por la cual no se consideraron como amplicones secuenciables y solo se secuenciaron ocho muestras que presentaron una buena intensidad, a partir de estas se obtuvieron tres secuencias consenso de 118 pb, las cuales fueron alineadas con 13 secuencias de nucleótidos de nueve especies del género, el modelo de sustitución usado fue JC+G calculado en Mega. A partir de la topología del árbol filogenético se puede apreciar que las secuencias L.eCBSCV TorG4, L.eCBSCV TorG8 y L.eCBSCV TorG34 recuperadas de *Lu. evansi* se agrupan con especies del complejo *Le. donovani* (figura 11), cuyo único representante en América es *Le. infantum*. Por tanto, teniendo en cuenta los altos valores de

soporte de rama se puede inferir que las secuencias nucleotídicas recuperadas de *Lu. evansi* corresponden a *Le. infantum*.

Por otro lado, de los dos grupos de *Lu. evansi* en los que se amplificó y secuenció el producto esperado para la región del *espaciador transcrito interno* (ITS 2), solo se logró obtener la secuencia consenso en una muestra de 761 pb, las cuales fueron alineadas con 12 secuencias homologas pertenecientes a doce especies del género *Leishmania*, el modelo de sustitución usado fue JC+G. A partir de la topología del árbol y los valores de soporte de rama se observó que la secuencia LeCBSJScVtG45 aislada de *Lu. evansi*, corresponde a *Le. braziliensis* (figura 12).

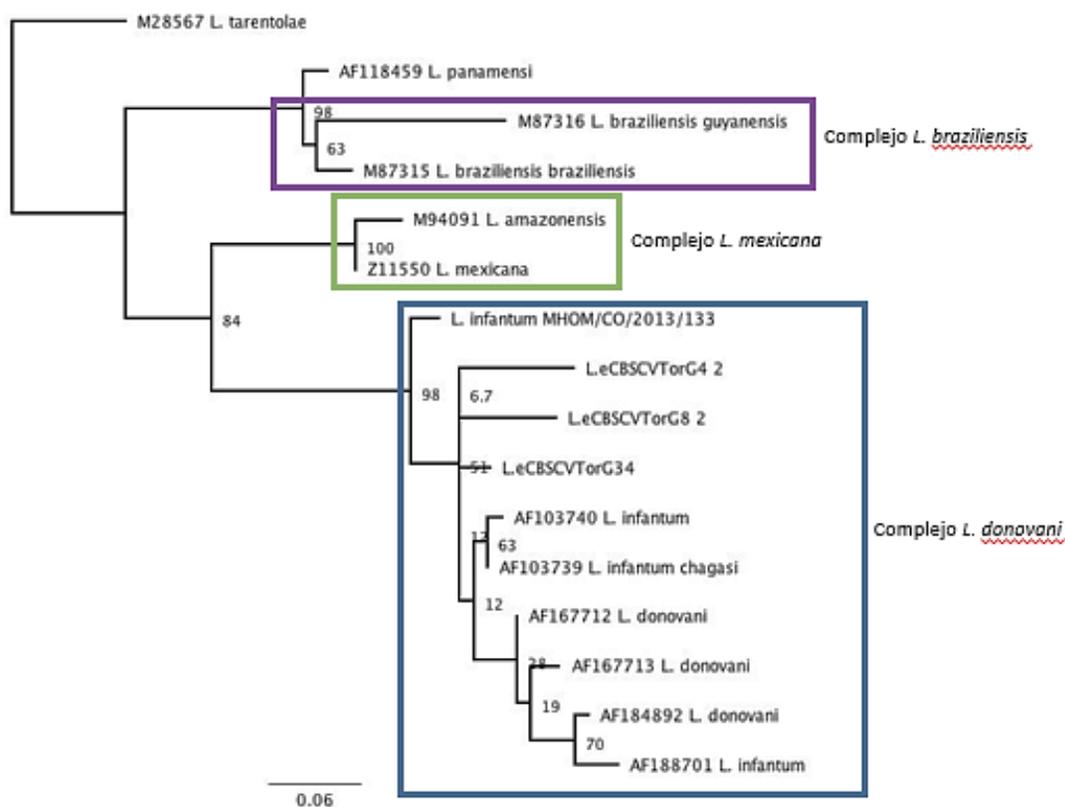


Figura.11. Análisis filogenético de la región conservada del minicírculo de las especies del género *Leishmania*. El análisis se realizó a partir de 16 secuencias de nucleótidos, en total se analizaron 118 posiciones, el modelo de sustitución fue JC+G, el método usado para hacer la reconstrucción filogenética fue máxima verosimilitud y se llevó a cabo en el programa Geneious® Versión 9 (Kearse et al., 2012). Fuente: Maira Alemán

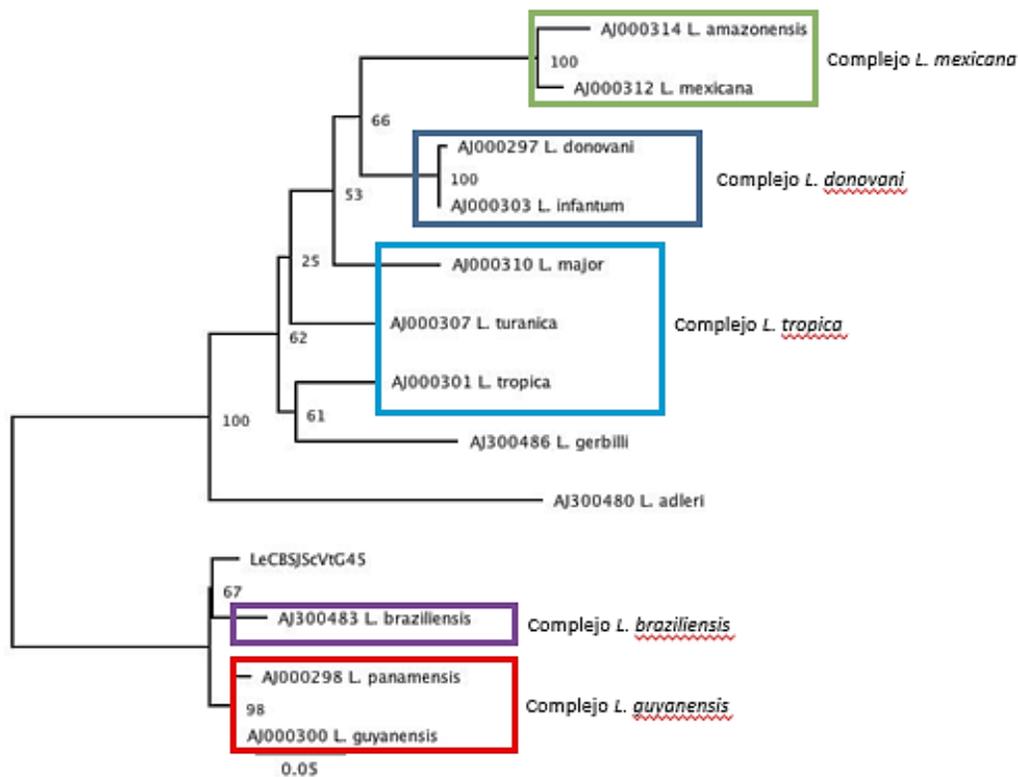


Fig.12. Análisis filogenético de la región (ITS 2) entre especies de diferentes subgéneros y complejos del género *Leishmania*. El análisis se realizó a partir de 13 secuencias de nucleótidos, en total se analizaron 761 posiciones, el modelo de sustitución fue JC+G y el método usado para hacer la reconstrucción filogenética fue máxima verosimilitud y se llevó a cabo en el programa Geneious® Versión 9 (Kearse et al., 2012). Fuente: Maira Alemán

5. DISCUSIÓN

La fauna flebotomínea de la vereda Toro estuvo representada por tres especies del género *Lutzomyia* que fueron *Lu. evansi*, *Lu. dubitans* y *Lu. trinidadensis*, las cuales no habían sido registradas en el área, por lo tanto son nuevos registros para el municipio de San Juan Nepomuceno, con lo que se amplía la distribución conocida de especies de flebotomíneos en el departamento de Bolívar. En el departamento de Bolívar se ha informado, a la fecha, la presencia 19 especies de *Lutzomyia* de las 153 registradas para Colombia (Bejarano & Estrada, 2016).

La abundancia de *Lu. evansi* en la vereda Toro, especie que constituyó el 99,60% de los flebotomíneos recolectados durante el presente estudio, es semejante a la observada en otras localidades de Los Montes de María y el Caribe colombiano donde la leishmaniasis es endémica (Cochero, 2003; P.-D. Cortés, et al, 2009; DORIA, OVIEDO, & Bejarano, 2008; Gallego & Vélez, 1994), lo que confirma que está es la especie flebotomínea predominante en la región. La mayor parte de los flebotomíneos se colectaron en el área utilizada para el pastoreo del ganado vacuno, lo que es consistente con datos observados en trabajos previos que indican que el ganado vacuno puede servir como fuente de alimentación de las hembras para el desarrollo de su progenie (MOREIRA et al., 2003; Paternina et al., 2016).

Si bien se encontraron tres especies de flebotomíneos en la zona muestreada, solo *Lu. evansi* ha sido incriminada como vector de *Leishmania* spp. en Colombia (B. Travi et al., 1990), en la Costa Caribe esta especie es el principal vector de *Le. infantum* y de *Le. braziliensis* en la región de Los Montes de María (E. Bejarano, Pérez-Doria, Paternina, Paternina-Gómez, & Martínez, 2012; Cochero, 2003; ESTRADA, APONTE, & BEJARANO, 2015).

El hallazgo de *Le. infantum* y *Le. braziliensis* en muestras de flebotomíneos de la vereda Toro, del municipio de San Juan Nepomuceno son consistentes con trabajos previos realizados por

(Romero Ricardo, 2015), en un municipio cercano El Carmen de Bolívar, en el que se encontró una frecuencia de infección del 0,07% para cada especie (Romero Ricardo, 2015). Así mismo, en un estudio realizado en el municipio de Ovejas se encontró que esta especie flebotomínea se infecta con parásitos del complejo *Le. braziliensis* (A. Pérez-Doria, 2011), y coincide con el aislamiento y tipificación de una cepa de *Le. braziliensis* a partir de *Lu. evansi* (A. Pérez-Doria, Romero, L., Martínez, M., Rivero, M., & Bejarano, E. E, 2015). Es importante resaltar que estas localidades hacen parte de la subregión Los Montes de María, que históricamente ha aportado la mayor cantidad de casos de la forma visceral y cutánea de los municipios de Sucre y Bolívar, y que en esta región previamente se había informado de los hábitos antropofílicos y zoofílicos de *Lu. evansi* (P.-D. Cortés, et al, 2009; Paternina et al., 2016), con lo que se demuestra que este flebotomíneo está en contacto con potenciales reservorios y con el humano, dos factores esenciales en la incriminación vectorial.

La abundancia de *Lu. evansi* en todos los sitios muestreados, sumada a la frecuencia de infección natural con el parásito en la zona y a los antecedentes epidemiológicos como vector de *Le. infantum* en otros lugares del Caribe, como San Andrés de Sotavento en Córdoba (B. Travi et al., 1990), Cartagena en Bolívar (Fuya, Piscioti, Pérez, Lugo, & Ferro, 2011) sugieren que esta especie pudo haber estado implicada en la aparición del caso de leishmaniasis visceral que se presentó en la vereda Toro del municipio San Juan Nepomuceno.

Sobre los antecedentes vectoriales de las demás especies registradas en la Vereda Toro, *Lu. trinidadensis* se ha encontrado infectada en la naturaleza con *Leishmania* spp. en Venezuela (Bonfante-Garrido, Urdaneta, Urdaneta, & Alvarado, 1990) y con relación a *Lu. dubitans* se desconoce su papel vectorial e importancia médica (L. A. Cortés & Fernández, 2008).

No todos los flebotomíneos del género *Lutzomyia* son vectores de *Leishmania* spp. ya que existen diferencias en su capacidad para el desarrollo y transmisión del parásito. Para incriminar a una especie flebotomínea existen unos requisitos que deben cumplirse, entre los cuales está que la especie debe ser antropofílica; debe picar a hospedadores reservorios; debe infectarse, en la naturaleza, con la misma especie de *Leishmania* que infecta al humano; debe permitir el crecimiento pujante del parásito que transmite y debe ser capaz de transmitir el parásito por picadura (Killick-Kendrick, 1990; OMS, 2010). Con los resultados del presente trabajo se pudo generar evidencia que demuestra que al menos dos especies del género *Lutzomyia* están en capacidad de infectarse con los parásitos del género *Leishmania* y que lo hacen con la frecuencia mínima de infección del 0,186% con (ITS) y del 2,79% con la región conservada del minicírculo, que es consistente con la tasa de infección con *Leishmania* que exhiben otros flebotomíneos vectores, la cual oscila entre 0,06 y 3,9% (Gomez et al., 2014; Kato et al., 2007; Paiva, Oliveira, Dorval, Galati, & Malafrente, 2010; Santamaría et al., 2006).

Teniendo en cuenta los hallazgos de abundancia, los antecedentes epidemiológicos de *Lu. evansi*, sus hábitos antropofílicos y zoofílicos, y la frecuencia de infección, es posible que *Lu. evansi* participe en la transmisión de los parásitos causantes de la forma visceral de la enfermedad. Puesto que, así mismo, aunque hasta la fecha no se han descrito casos de la forma cutánea de la enfermedad, el hallazgo de parásitos causantes de la forma cutánea (*Le. braziliensis*) en *Lu. evansi*, sumado a sus probados hábitos antropofílicos y su alta abundancia representan un factor que incrementaría las posibilidades de que se describan casos autóctonos de la forma cutánea de la enfermedad.

La detección de infección natural con *Leishmania* en *Lutzomyia* por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido ampliamente usada en estudios entomológicos de la

leishmaniasis debido a su alta sensibilidad en comparación con el método tradicional de disección del tracto intestinal (de Bruijn, 1992; Michalsky, Fortes-Dias, Pimenta, Secundino, & Dias, 2002). Estudios realizados anteriormente han confirmado la utilidad de los cebadores 13A y 13B desarrollados por Rogers et al. (1990) en la detección de *Leishmania* spp. (Belli, Rodriguez, Aviles, & Harris, 1998; Lastre-Meza, 2015). El ADNk ha sido usado como blanco molecular tanto para la identificación como para la genotipificación de diferentes especies de *Leishmania* (Alonso, Costa, de Mendonça, Costa, & Ribolla, 2010; Aransay, Scoulica, & Tselentis, 2000; Cortes et al., 2006; Nasereddin et al., 2009; Noyes, Reyburn, Bailey, & Smith, 1998; Rogers & Wirth, 1987; Segatto et al., 2012). Como principal ventaja se destaca su alta sensibilidad, gracias a que existen aproximadamente 10.000 a 20.000 copias de los minicírculos del ADNk en un solo parásito (Noyes et al., 1998; Yurchenko, Merzlyak, Kolesnikov, Martinkina, & Vengerov, 1999). Esto explicaría el mayor número de grupos de flebotómíneos que fueron positivos con este marcador molecular comparado con ITS.

En cuanto a la época en la que se realizó el muestreo en el mes de mayo, la abundancia de hembras capturadas y el hallazgo de infección natural, se puede decir que estos hallazgos contrastan con trabajos similares realizados en Los Montes de María (A. Pérez-Doria, 2011) y zona urbana del municipio de Sincelejo (Vivero et al., 2009), donde se ha registrado que durante los meses con bajas precipitaciones *Lu. evansi* exhibe una menor abundancia, sin embargo, aunque la abundancia es disimilar, la frecuencia de infección encontrada y la época del año son similares, posiblemente, las hembras que sobrevivieron a las condiciones climáticas tuvieron la oportunidad de alimentarse varias veces y con ello incrementaron las posibilidades de adquirir los parásitos. La abundancia de flebotómíneos positivos en el extradomicilio podría evidenciar la existencia de un ciclo enzoótico de transmisión, de ahí la necesidad de establecer medidas prevención y control

de los vectores en este hábitat. Se debe considerar que el presente trabajo corresponde a un estudio de tipo transversal y descriptivo, en el cual los especímenes no fueron capturados en la época donde probablemente ocurrió la infección sino en las semanas posteriores al registro del caso clínico, lo que demuestra la circulación del parásito en el área.

Finalmente, debido a la presencia de flebotomíneos infectados en el área rural del corregimiento de San Cayetano, es necesario establecer medidas de control y vigilancia entomológica debido al potencial riesgo de la transmisión vectorial de *Leishmania* spp. para los habitantes de esta zona.

6. CONCLUSIONES

- *Lu. evansi* es la especie de flebotomíneo más abundante en la vereda Toro.
- *Lu. evansi* se infecta naturalmente con *Le. infantum* y *Le. braziliensis*.
- La presencia de *Lu. evansi* infectadas con *Leishmania* constituye un riesgo de transmisión del parásito en la comunidad de la vereda Toro.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar una captura serial a lo largo del año, que involucre tanto la época seca como la época de lluvias, para establecer si existen variaciones temporales en la abundancia de los flebotomíneos y en la frecuencia de infección, que permitan establecer cuáles serían las épocas del año donde existe mayor riesgo de infección para el humano.
- Implementar el uso de diferentes métodos de muestreo para obtener un conocimiento amplio acerca de la composición de la fauna flebotomínea presente en la zona.
- Identificar los animales que actúan como reservorios de *Leishmania* spp. y mantienen activos los ciclos de transmisión del parásito.

BIBLIOGRAFÍA

- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*, *10*(3), e0004349.
- Alonso, D. P., Costa, D. L., de Mendonça, I. L., Costa, C. H. N., & Ribolla, P. E. M. (2010). Heterogeneity of *Leishmania infantum* chagasi kinetoplast DNA in Teresina (Brazil). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *82*(5), 819-821.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, *215*(3), 403-410.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., . . . Team, W. L. C. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLOS ONE*, *7*(5), e35671.
- Alvar J, V. I., Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. (2012). WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence *PLOS ONE*, *7*, (5). doi: doi: 10.1371/ journal.pone.0035671
- Arango, C., Dorado, J., Guzmán, D., & Ruíz, J. F. . (2012.). Climatología Trimestral de Colombia. Bogotá: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia.
- Aransay, A. M., Scoulica, E., & Tselentis, Y. (2000). Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Applied and environmental microbiology*, *66*(5), 1933-1938.
- Asato, Y., Oshiro, M., Myint, C. K., Yamamoto, Y., Kato, H., Marco, J. D., . . . Uezato, H. (2009). Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. *Exp Parasitol*, *121*(4), 352-361. doi: 10.1016/j.exppara.2008.12.013
- Assembly, W. H. (2007). World Health Assembly The World Health Assembly Resolution (WHA60.13) on the "Control of leishmaniasis". *Geneva, Switzerland*, 5p.
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, *37*(10), 1097-1106. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003
- Bejarano, & Estrada. (2016). Catalogue of Diptera of Colombia. *Zootaxa*, *4122* (1)
- Bejarano, E., Pérez-Doria, A., Paternina, L., Paternina-Gómez, M., & Martínez, L. (2012). Natural infection of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania* (*Viannia*) spp. in northern Colombia. *Am J Trop Med Hyg*, *87*, 173.
- Bejarano, E. E. (2015). FLEBOTOMÍNEOS ASOCIADOS A LA TRANSMISIÓN DE LEISHMANIA (*VIANNIA*) SPP. EN EL ÁREA URBANA DEL MUNICIPIO DE OVEJAS, SUCRE, COLOMBIA *Sistema Universitario Estatal del Caribe Colombiano-SUE Caribe Programa de Doctorado en Medicina Tropical*.
- Bejarano, E. E., S. Uribe, et al. (2001). "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*, *95*(1):, 27-28. .
- Bejarano, E. E., Uribe, S., Rojas, W., & Darío Vélez, I. (2002). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *97*(5), 645-647.
- Belli, A., Rodriguez, B., Aviles, H., & Harris, E. (1998). Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *58*(1), 102-109.

- Boelaert, M., Meheus, F., Sanchez, A., Singh, S., Vanlerberghe, V., Picado, A., . . . Sundar, S. (2009). The poorest of the poor: a poverty appraisal of households affected by visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Tropical medicine & international health*, 14(6), 639-644.
- Bonfante-Garrido, R., Urdaneta, R., Urdaneta, I., & Alvarado, J. (1990). Natural infection of *Lutzomyia trinidadensis* (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85(4).
- Brilhante, A. F., Nunes, V. L., Kohatsu, K. A., Galati, E. A., Rocca, M. E., & Ishikawa, E. A. (2015). Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in an area of ecotourism in Central-Western Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 21, 39. doi: 10.1186/s40409-015-0041-8
- Cárdenas, R., Pabón, E., Anaya, H., & Sandoval, C. (2005). Presencia de *Lutzomyia longiflora* (Diptera: Psychodidae) en el foco de leishmaniasis tegumentaria americana del municipio de Ábrego, Norte de Santander. *Primer registro para el departamento. Clon*, 3(1), 7-14.
- Castillo Arroyo, P., Bejarano, E. E., & Pérez-Doria, A. (2011). Validación de las trampas CDC con Diodos Emisores de Luz (LED) en la captura de insectos flebotómíneos (Diptera: Psychodidae). *Universidad De Sucre Tesis*.
- Cochero, S. (2003). Papel de *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) como vector de leishmaniasis visceral en un foco de Los Montes de María (tesis). *Sincelejo: Universidad de Sucre*.
- Cochero, S., & Blanco, P. (2003). *Papel de Lutzomyia evansi (Diptera: Psychodidae) como vector de leishmaniasis visceral en un foco de Los Montes de María*. Tesis de Bióloga con énfasis en Biotecnología. Universidad de Sucre, Facultad de Educación y Ciencias, Sincelejo, Colombia.
- Collins F., M. M., Rasmussen M., Mehaffey P., Besansky N., Finnerty V. (1987). A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. . *The American journal of tropical medicine and higiene*, 37, 37.
- Corredor, A., Gallego, J. F., Tesh, R. B., Morales, A., de Carrasquilla, C. F., Young, D. G., . . . Caceres, E. (1989). Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40(5), 480-486.
- Cortés, L., & Pereira, R. (2011). "Evaluación ecoepidemiológica de la leishmaniasis en El Carmen de Bolívar." *Biomédica*, 31(95): 95.
- Cortés, L. A. (2006). Foco de leishmaniasis en el Hobo, municipio de El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. *Biomédica*, 26, 236-241.
- Cortés, L. A., & Fernández, J. J. (2008). Especies de *Lutzomyia* en un foco urbano de leishmaniasis visceral y cutánea en El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. *Biomédica*, 28(3).
- Cortés, P.-D., et al. (2009). "Flebotómíneos (Diptera: Psychodidae) antropofílicos de importancia en salud pública en Los Montes de María, Colombia." *REV CUBANA MED TROP* 61(3): 6. .
- Cortes, S., Mauricio, I., Almeida, A., Cristovão, J. M., Pratlong, F., Dedet, J. P., & Campino, L. (2006). Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitology international*, 55(4), 277-283.
- Cupolillo, E., Grimaldi Jr, G., Momen, H., & Beverley, S. M. (1995). Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology*, 73(1-2), 145-155.
- DANE, D. A. N. d. E. (2005).

- de Almeida, M. E., Steurer, F. J., Koru, O., Herwaldt, B. L., Pieniazek, N. J., & da Silva, A. J. (2011). Identification of *Leishmania* spp. by molecular amplification and DNA sequencing analysis of a fragment of the rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). *Journal of clinical microbiology*, JCM. 01177-01111.
- de Bruijn, M. H., & Barker, D. C. (1992). Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop*, 52(1), 45-58.
- Desjeux. (1996). Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*, 14, 417-423.
- DORIA, A. P., OVIEDO, E. H., & BEJARANO, E. E. (2008). *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) from the reserva Serranía de Coraza y Montes de María, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 34(1), 98-101.
- Dye, C. (1990). Epidemiological significance of vector-parasite interactions. *Parasitology*, 101(3), 409-415.
- El Tai, N., Osman, O., El Fari, M., Presber, W., & Schönian, G. (2000). Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5), 575-579.
- ESTRADA, L. G., APONTE, O. A., & BEJARANO, E. E. (2015). REGISTROS NUEVOS DE ESPECIES DE *Lutzomyia* (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EN EL DEPARTAMENTO DE CESAR, COLOMBIA. *Acta Biológica Colombiana*, 20, 225-228.
- Fernandez, C., Manzur, J., Echenique, H & et.al. (2010). enfermedades infecciosas | leishmaniasis visceral. 1-43.
- Fernández, M. (2012). Eco-epidemiología de vectores de *Leishmania* spp. en el noreste de la Argentina (Provincia de Misiones)” (tesis). . *Universidad de Buenos Aires*.
- Ferro, C., López, M., Fuya, P., Lugo, L., Cordovez, J. M., & González, C. (2015). Spatial distribution of sand fly vectors and eco-epidemiology of cutaneous leishmaniasis transmission in Colombia. *PLOS ONE*, 10(10), e0139391.
- Ferro, C., Marín, D., Góngora, R., Carrasquilla, M. C., Trujillo, J. E., Rueda, N. K., . . . Pérez, M. (2011). Phlebotomine vector ecology in the domestic transmission of American cutaneous leishmaniasis in Chaparral, Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(5), 847-856.
- Ferro, C., Morrison, A. C., Torres, M., Pardo, R., Wilson, M. L., & Tesh, R. B. (1995). Age Structure, Blood-Feeding Behavior, and *Leishmania chagasi* Infection in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis in Colombia. *Journal of Medical Entomology*, 32(5), 618-629. doi: 10.1093/jmedent/32.5.618
- Flórez, M., Martínez, J. P., Gutiérrez, R., Luna, K. P., Serrano, V. H., Ferro, C., . . . Sandoval, C. M. (2006). *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) en un foco suburbano de leishmaniosis visceral en el Cañón del Chicamocha en Santander, Colombia. *Biomédica*, 26(Supl 1), 109-120.
- Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J.-C., & Van der Auwera, G. (2010). Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2), 238-245.
- Fuya, P., Piscioti, I., Pérez, S., Lugo, L., & Ferro, C. (2011). Presencia de *Lutzomyia evansi* (Núñez-Tovar, 1924) vector de *Leishmania chagasi* en área urbana de Cartagena,

- Colombia. XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. *Biomédica*, 31(sup 3), 23-205.
- Galati, E. (2015). Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). Classificação, morfologia, terminologia e identificação de Adultos. Apostila da Disciplina HEP 5752—Bioecologia e Identificação de Phlebotominae 2014, Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. 22 august 2014.
- Gallego, J. I., & Vélez, I. D. (1994). Presencia en Isla Fuerte, Bolívar de *Lutzomyia evansi* vector de leishmaniosis visceral. *Iatreia*, 7(1), 33-35.
- Gomez, E. A., Kato, H., & Hashiguchi, Y. (2014). Man-biting sand fly species and natural infection with the *Leishmania* promastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. *Acta Trop*, 140, 41-49.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59(3), 307-321.
- Kato, H., Uezato, H., Gomez, E. A., Terayama, Y., Calvopiña, M., Iwata, H., & Hashiguchi, Y. (2007). Establishment of a mass screening method of sand fly vectors for *Leishmania* infection by molecular biological methods. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(2), 324-329.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., . . . Duran, C. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and veterinary entomology*, 4(1), 1-24.
- Kreutzer RD, C. A., Grimaldi G Jr, Grogl M, Rowton ED, Young DG, Morales A, McMahon-Pratt D, Guzman H, Tesh RB. (1991). Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *Am J Trop Med Hyg*, 44, 662-675.
- Lainson, R., & Shaw, J. J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. . In Peters, W. and Killick-Kendrick, R. (Eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1., Academic Press, London, 1-120.
- Lambrano Cruz, L. F., Manjarrez Pinzón, G., & Bejarano Martínez, E. E. (2012). Variación temporal de especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en el área urbana de Sincelejo (Colombia). *Salud Uninorte*, 28(2).
- Lastre-Meza, N., Pérez-Doria, A & Bejarano, E.E. (2015). Diseño y validación de una PCR-dúplex para la detección de infección natural con *Leishmania* spp. en flebotominos *Biomédica*, 35(Supl.4):72-222.
- Luyo-Acero, G. E., Uezato, H., Oshiro, M., Takei, K., Kariya, K., Katakura, K., . . . Nonaka, S. (2004). Sequence variation of the Cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology*, 128(5), 483-491. doi: 10.1017/s0031182004004792
- MAROLI, M., FELICIANGELI, M. D., BICHAUD, L., CHARREL, R. N. and GRADONI, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of

- public health concern. *Medical and veterinary entomology*, 27 123–147. doi: doi:10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x
- Mauricio, I., Stothard, J., & Miles, M. (2004). Leishmania donovani complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. *Parasitology*, 128(3), 263-267.
- Michalsky, É. M., Fortes-Dias, C. L., Pimenta, P. F., Secundino, N. F., & Dias, E. S. (2002). Assessment of PCR in the detection of Leishmania spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44(5), 255-259.
- Montoya-Lerma, J. (1996). "The biology of visceral leishmaniasis vector in the San Andrés de Sotavento focus, Colombia." (tesis). *London School of Hygiene and Tropical Medicine*. .
- Montoya-Lerma, J., & Lane, R. P. (1996). Factors affecting host preference of Lutzomyia evansi (Diptera: Psychodidae), a vector of visceral leishmaniasis in Colombia. *Bulletin of Entomological Research*, 86(1), 43-50.
- Morales, A., Corredor, A., Cáceres, E., Ibagos, A. L., & de Rodríguez, C. (1981). Aislamiento de tres cepas de Leishmania a partir de Lutzomyia trapidoi en Colombia. *Biomédica*, 1(4), 198-207.
- MOREIRA, E. D., DE SOUZA, V. M. M., SREENIVASAN, M., LOPES, N. L., BARRETO, R. B., & DE CARVALHO, L. P. (2003). PERIDOMESTIC RISK FACTORS FOR CANINE LEISHMANIASIS IN URBAN DWELLINGS: NEW FINDINGS FROM A PROSPECTIVE STUDY IN BRAZIL. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(4), 393-397. doi: doi:https://doi.org/10.4269/ajtmh.2003.69.393
- Moreno, M., Ferro, C., Rosales-Chilama, M., Rubiano, L., Delgado, M., Cossio, A., . . . Saravia, N. G. (2015). First report of Warileya rotundipennis (Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected with Leishmania (Viannia) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Acta Trop*, 148, 191-196.
- MPS. (2005). Guía de Atención de la Leishmaniasis *Ministerio de la Protección Social*.
- Munoz-Mantilla, G. (1998). *The sandfly vectors and epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Landazury Focus, Colombia*. London School of Hygiene & Tropical Medicine.
- Nasereddin, A., Azmi, K., Jaffe, C. L., Erekat, S., Amro, A., Sawalhah, S., . . . Abdeen, Z. (2009). Kinetoplast DNA heterogeneity among Leishmania infantum strains in central Israel and Palestine. *Veterinary parasitology*, 161(1), 126-130.
- Noyes, H. A., Reyburn, H., Bailey, J. W., & Smith, D. (1998). A nested-PCR-based schizodeme method for identifying Leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of Leishmania tropica in Pakistan. *Journal of clinical microbiology*, 36(10), 2877-2881.
- Odiwuor, S., Vuylsteke, M., De Doncker, S., Maes, I., Mbuchi, M., Dujardin, J.-C., & Van der Auwera, G. (2011). Leishmania AFLP: paving the way towards improved molecular assays and markers of diversity. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 960-967.
- OMS. (2010). Control de las leishmaniasis. *Organizacion Mundial de la Salud*.
- OMS.(2014)Leishmaniasis cutánea, mucosa Y visceral.from https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417%3A2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&catid=3940%3Anid-content-general&Itemid=39345&lang=es
- OMS. (2017). Leishmaniasis. from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>

- Paiva, B., Oliveira, A., Dorval, M., Galati, E. A. B., & Malafronte, R. (2010). Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Acta Trop*, *115*(1-2), 126-130.
- Pan American Health Organization, P. f. R. a. T. i. T. D., & (SOPERJ), T. a. S. d. P. d. E. d. R. d. J. (Rio de Janeiro, Brazil, 6–7 November 2007). Update of American Trypanosomiasis and Leishmaniasis Control and Research: Final Report. *512-2008. 111-118*.(PAHO/HDM/CD/).
- Paternina, L. E., Verbel-Vergara, D., Romero-Ricardo, L., Pérez-Doria, A., Paternina-Gómez, M., Martínez, L., & Bejarano, E. E. (2016). Evidence for anthropophily in five species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification of bloodmeals. *Acta Trop*, *153*, 86-92.
- Pereira, A. J., Teles, C., Marialva, E., Pessoa, F., & Medeiros, J. (2015). Ecological aspects and molecular detection of *Leishmania* DNA Ross (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in terra firme and várzea environments in the Middle Solimões Region, Amazonas State, Brazil. *Parasit Vectors*, *8*, 180-180.
- Pérez-Doria, A. (2011). BÚSQUEDA DE INFECCIÓN NATURAL CON PARÁSITOS CAUSANTES DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA EN POBLACIONES FLEBOTOMÍNEAS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EN LOS MONTES DE MARIA, SUCRE, COLOMBIA. *Programa de maestría en microbiología, UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (Tesis)*.
- Pérez-Doria, A., Romero, L., Martínez, M., Rivero, M., & Bejarano, E. E. (2015). Aislamiento y tipificación de una cepa de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* a partir de *Lutzomyia evansi* en el municipio de Colosó, Sucre *Biomédica*, *35*(Suplemento No. 4, XVI. Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical), 112.
- Pérez-Doria A., R., L. R., Laztre, M., & Bejarano, E. E. (2008). Cambiando la forma de extraer el ADN en insectos vectores (Diptera: Psychodidae) de *Leishmania* spp *Memorias del XXXV Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología*.
- Pérez-Doria, A., Paternina, L., Paternina, M., Martínez, L., Verbel-Vergara, D., & Bejarano, E. (2011). Infección natural de *Lutzomyia evansi* con especies del complejo *Leishmania braziliensis* causantes de leishmaniasis cutánea en la Costa Caribe colombiana. *Biomédica*, *31*(3), 23-205.
- Quiroga, C., Cevallos, V., Morales, D., Baldeón, M. E., Cárdenas, P., Rojas-Silva, P., & Ponce, P. (2017). Molecular Identification of *Leishmania* spp. in Sand Flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) From Ecuador. *Journal of Medical Entomology*, *54*(6), 1704-1711.
- Ramirez, J. D., Hernandez, C., Leon, C. M., Ayala, M. S., Florez, C., & Gonzalez, C. (2016). Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Sci Rep*, *6*, 28266. doi: 10.1038/srep28266
- Rêgo, F. D., Rugani, J. M. N., Shimabukuro, P. H. F., Tonelli, G. B., Quaresma, P. F., & Gontijo, C. M. F. (2015). Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous leishmaniasis focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. *PLOS ONE*, *10*(4), e0122038.
- Rodgers, M. R., Popper, S. J., & Wirth, D. F. (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol*, *71*(3), 267-275.
- Rogers, W. O., & Wirth, D. F. (1987). Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *84*(2), 565-569.

- Romero Ricardo, L., Pérez-Doria, A., Rodríguez, J. L., Vergara, J., Montesino, A., Martínez, L., Cochero, S., Cortés, L & Bejarano Martínez, E. E. (2015). *Lutzomyia evansi* como vector permisivo de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania infantum* en el departamento de Bolívar, Colombia. *Biomédica*, 35, 185.
- Saf'janova, V. (1982). Classification of the genus *Leishmania* Ross. *In the Leishmanias. Protozoology, Part 7*, 220.
- Sánchez, L., Sáenz, E., Pancorbo, J., Zegarra, R., Garcés, N & Regis, A. (2004). <Leishmaniasis.pdf>. *Dermatología Peruana*, 14, 82-98.
- Santamaría, E., Ponce, N., Zipa, Y., & Ferro, C. (2006). Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia. *Biomédica*, 26, 82-94.
- Schmid, & Tognazzo. (2010). Molecular Divergence Defines Two Distinct Lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), Parasites of Bumblebees". *J. Eukaryot. Microbiol.*
- Schönian, G., Schnur, L., El Fari, M., Oskam, L., Kolesnikov, A. A., Sokolowska-Köhler, W., & Presber, W. (2001). Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(2), 217-224.
- Seccombe, A. K. (1993). Catalogue of Old World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Natural History Museum*.
- Segatto, M., Ribeiro, L. S., Costa, D. L., Costa, C. H. N., Oliveira, M. R. d., Carvalho, S. F. G., . . . Brito, C. F. A. d. (2012). Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(1), 39-47.
- Sitio oficial de San Juan Nepomuceno en Bolívar, C. (2012). Nuestro municipio. Información General. *Bolívar, Alcaldía de San Juan Nepomuceno*
- SIVIGILA. (2013, 2014, 2015, 2016, 2017). Vigilancia Rutinaria por evento Departamental y Municipal. *Sistema de Vigilancia en Salud Pública*.
- SIVIGILA. (2015). Vigilancia Rutinaria por evento Departamental y Municipal. *Sistema de Vigilancia en Salud Pública*.
- Travi, B., Vélez, I., Brutus, L., Segura, I., Jaramillo, C., & Montoya, J. (1990). *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(5), 676-677.
- Travi, B. L., Montoya, J., Gallego, J., Jaramillo, C., Llano, R., & Velez, I. D. (1996). Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) Vector of Visceral Leishmaniasis in Northern Colombia. *Journal of Medical Entomology*, 33(3), 278-285. doi: 10.1093/jmedent/33.3.278
- Travi, B. L., Montoya, J., Solarte, Y., Lozano, L., & Jaramillo, C. (1988). Leishmaniasis in Colombia. I. Studies on the phlebotomine fauna associated with endemic foci in the Pacific Coast region. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 39(3), 261-266.
- Trujillo, A. V., Reina, A. E. G., Orjuela, A. G., Suarez, E. P., Palomares, J. E., & Alvarez, L. S. B. (2013). Seasonal variation and natural infection of *Lutzomyia antunesi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), an endemic species in the Orinoquia region of Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(4), 463-469.
- Uribarren, T. (2011). LEISHMANIOSIS o LEISHMANIASIS. *Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)*.

- Vásquez-Trujillo, A., Santamaría-Herreño, E., González-Reina, A. E., Buitrago-Álvarez, L. S., Góngora-Orjuela, A., & Cabrera-Quintero, O. L. (2008). *Lutzomyia antunesi* as suspected vector of cutaneous leishmaniasis in the Orinoquian region of Colombia. *Revista de Salud Pública*, 10(4), 625-632.
- Vivero, R. J., Bejarano, E. E., Pérez-Doria, A., Flórez, F., Estrada, L. G., Torres, C., & Muskus, C. (2009). Nuevos registros de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), con el hallazgo de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), en los alrededores de la Ciudad de Sincelejo, Colombia. *Biota Neotrópica*, 9(4), 277.
- Watanabe, M. (1999). *Rapid and inexpensive recovery method of DNA fragments from agarose and polyacrylamide gels by a cotton-wool column tube*. Paper presented at the Nucleic acids symposium series.
- Young, A. (1992). Phlebotomine Sandflies in the Americas. Pan American Health Organization. . *Washington. Technical Paper No. 33*.
- Young, D., Morales, A., Kreutzer, R., Alexander, J., Corredor, A., & Tesh, R. (1987). Isolations of *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from cryopreserved colombian sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 24(5), 587-589.
- Young, D. G., & Duncan, M. A. . (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, 1-887, 1-881.
- Young, D. G., & Lawyer, P. G. (1987). New World vectors of the leishmaniasis *Current topics in vector research* (pp. 29-71): Springer.
- Yurchenko, V., Merzlyak, E., Kolesnikov, A., Martinkina, L., & Vengerov, Y. (1999). Structure of *Leishmania* minicircle kinetoplast DNA classes. *Journal of clinical microbiology*, 37(5), 1656-1657.
- Zambrano, C., Ayala, M., Fuya, O., Montenegro, C., Ayala, N., Rodríguez, J & et.al. (2015). Brote urbano de leishmaniasis visceral en Neiva, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 17(4), 514-527. doi: 10.15446/rsap.v17n4.44663
- Zambrano, C., Fuya, P., et al. (2015). Cartagena: nuevo foco de leishmaniasis visceral urbana en Colombia. *Revista Ciencia en Desarrollo*, 7 No. 1 83-91.