

UNIVERSIDAD DE SUCRE, SINCELEJO, COLOMBIA

Infeción natural de *Lutzomyia cayennensis cayennensis* con parásitos tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Los Montes de María, Colombia

Biol. Suljei Cochero,¹ Est. Yosed Anaya,² Est. Yirys Díaz,² Est. Margaret Paternina,² Est. Arturo Luna,² Est. Luis Paternina,² y Dr. Eduar Elías Bejarano³

RESUMEN

Se determinó la presencia de flebotomíneos naturalmente infectados con parásitos tripanosomatídeos en Los Montes de María, Colombia, región endémica de leishmaniosis visceral y cutánea. Los especímenes se colectaron usando trampas de luz tipo CDC y trampas de papel impregnado con aceite de ricino instaladas en el intradomicilio y peridomicilio. Se identificaron 6 especies de *Lutzomyia* entre los 159 flebotomíneos recolectados: *Lu. evansi*, *Lu. cayennensis cayennensis*, *Lu. trinidadensis*, *Lu. atroclavata*, *Lu. gomezi* y *Lu. dubitans*. En un grupo de 9 hembras de *Lu. cayennensis cayennensis* se amplificó un segmento de ADN de 800 pb del gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña ribosomal (ssrRNA) de la familia Trypanosomatidae. Este hallazgo constituyó la primera evidencia de infección natural de *Lu. cayennensis cayennensis* con parásitos tripanosomatídeos en Los Montes de María.

Palabras clave: *Lutzomyia cayennensis cayennensis*, Trypanosomatidae, parasitología, Colombia.

En América la leishmaniosis es una enfermedad emergente y reemergente producida por el parásito tripanosomatídeo *Leishmania* Ross, 1903, el cual es transmitido al humano por distintas especies de flebotomíneos del género *Lutzomyia* França, 1924. Cada año se diagnostican en Colombia más de 18 000 casos nuevos de leishmaniosis,¹ aunque se acepta la existencia de un considerable subregistro.² En la costa caribe colombiana, tanto la leishmaniosis cutánea como la visceral constituyen un importante problema de salud pública por el carácter endémico que presentan en áreas rurales de la región, en especial en Los Montes de María, que históricamente ha constituido el foco de leishmaniosis visceral más importante del territorio nacional. Los

departamentos de Córdoba, Sucre y Bolívar aportaron 85 % de los casos de leishmaniosis visceral registrados en el país durante el último año.¹

Hasta la fecha se han encontrado 9 especies flebotomíneas naturalmente infectadas con *Leishmania* spp. en Colombia: *Lutzomyia longipalpis* (Lutz y Neiva, 1912) y *Lu. evansi* (Nuñez-Tovar, 1924) con *L. infantum* Nicolle, 1908; *Lu. spinicrassa* Morales, Osorno, Osorno y Muñoz, 1969, con *L. braziliensis* Vianna, 1911; *Lu. trapidoi* (Fairchild y Hertig, 1952), *Lu. yuilli* Young y Porter, 1972; *Lu. gomezi* (Nitzulescu, 1931) y *Lu. panamensis* (Shannon, 1926) con *L. panamensis* Lainson y Shaw, 1972; *Lu. umbratilis* Ward y Fraiha, 1977, con *L. guyanensis* Floch, 1954; y *Lu. hartmanni* (Fairchild y Hertig, 1957)

¹ Bióloga con énfasis en Biotecnología. Catedrática.

² Estudiante de Biología con énfasis en Biotecnología.

³ Magister en Ciencias Básicas Biomédicas. Docente Investigador.

con *L. colombiensis* Kreutzer, Corredor, Grimaldi, Grogl, Rowton, Young, Morales, McMahon-Pratt, Guzman y Tesh, 1991.³⁻⁹ De estas, *Lu. yuilli*, *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis*, *Lu. longipalpis* y *Lu. evansi* están presentes en Los Montes de María, donde la última ha sido incriminada como transmisor de leishmaniosis visceral,¹⁰ mientras se desconoce el vector de la forma cutánea. El objetivo del presente estudio fue identificar flebotomíneos naturalmente infectados con parásitos tripanosomatídeos, que pudieran ser seleccionados para posteriores estudios de incriminación vectorial en la región.

MÉTODOS

Área de estudio

La investigación se desarrolló en el área rural del municipio de Ovejas (75° 13' N, 9° 28' O), departamento de Sucre. Este municipio se encuentra ubicado sobre Los Montes de María a una altura de 277 m sobre el nivel del mar. Sus características ecológicas corresponden a bosque seco tropical, presenta una temperatura promedio anual de 26,7 °C, y precipitaciones de 1 114,8 mm anuales. Los flebotomíneos se recolectaron en las localidades de Flor del Monte, La Coquera, Salitral, Don Gabriel y Almagra, que previo al estudio registraron casos de leishmaniosis cutánea y visceral. Es importante resaltar que los primeros casos de leishmaniosis de la costa caribe colombiana aparecieron en Ovejas a finales de los setenta,¹¹ y mantienen hasta hoy un carácter endémico en el municipio, con el registro de 364 casos de la enfermedad entre 2000 y 2004 (Departamento Administrativo de Seguridad Social en Salud de Sucre-DASSSALUD, comunicación personal).

Colección e identificación de *Lutzomyia* spp.

Los muestreos entomológicos se realizaron semanalmente durante los meses de marzo y abril de 2005, con trampas de luz tipo CDC activadas entre las 18:00 y las 06:00 h y trampas de papel impregnado con aceite de ricino instaladas intradomicilio y peridomicilio. También se

efectuaron capturas de flebotomíneos que reposaban en el interior de viviendas donde habían ocurrido casos de leishmaniosis. Los especímenes colectados fueron preservados en etanol 70 % para su transporte hasta el Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre. La cabeza, un ala y los últimos segmentos abdominales de cada individuo fueron utilizados para la clasificación taxonómica de especie por medio de las claves de Young y Duncan.¹²

Extracción del ADN

De acuerdo con la clasificación taxonómica, las hembras fueron puestas en tubos Eppendorf en grupos de 2 a 9 ejemplares por especie. El ADN se extrajo con base en el protocolo de Collins y otros¹³ con las modificaciones siguientes. El contenido del vial fue homogenizado con un micropistilo de plástico en 60 mL de *buffer* de lisis (0,08 M NaCl, 0,16 M sacarosa, 0,06 EDTA, 0,5 % SDS, 0,1 M Tris-HCl) e incubado a 65 °C por 30 min. Seguidamente, se adicionaron 14 mL de acetato de sodio 8 M, se incubó sobre hielo durante 30 min y se centrifugó a 13 442 g por 10 min. El sobrenadante fue recolectado para la precipitación del ADN con 200 mL de etanol absoluto a 4 °C durante toda la noche. Después de centrifugar a 13 442 g por 20 min, el sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con 200 mL de etanol 70 % y luego con 200 mL de etanol absoluto. Por último, el ADN se secó a temperatura ambiente para ser resuspendido en 50 mL de agua estéril.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR, SIGLAS EN INGLÉS)

Para la reacción de amplificación se emplearon los cebadores SSU561F 5'-TGGGATAACAA AGGAGCA-3' y SSU561R 5'-CTGAGACTG TAACCTCAAAGC-3',¹⁴ los cuales amplifican un segmento de ADN de aproximadamente 800 pb del gen que codifica para el ARN de la pequeña subunidad ribosomal (ssrRNA) de la familia Trypanosomatidae Doflein, 1901. La PCR se realizó en un volumen total de 25 mL que contenía *buffer* de PCR 1X, 25 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 1U *Taq* ADN polimerasa (invitrogen), 5 mL del ADN

extraído y 20 pM de cada cebador. La mezcla de reacción fue incubada en un termociclador Hybaid PCR Express bajo los parámetros descritos a continuación. Desnaturalización inicial del ADN a 94 °C durante 3 min, seguido por 35 ciclos consistentes de desnaturalización por 1 min a 90 °C, alineamiento durante 1 min a 50 °C y extensión a 72 °C por 1 min, finalizando con una extensión de 10 min a 72 °C. Además de las muestras objeto de estudio, se incluyó un control negativo y uno positivo constituido por ADN de *L. infantum*.

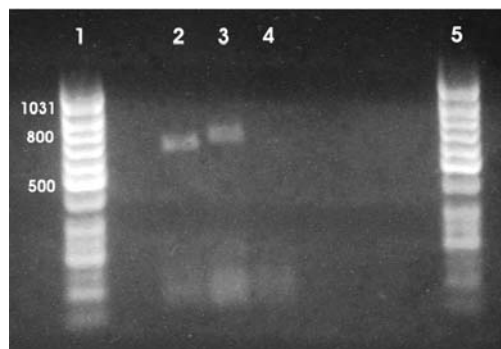
Análisis del ADN por electroforesis en gel de agarosa

Del producto amplificado se tomaron 12 mL que fueron mezclados con 2 mL de *buffer* de carga (azul de bromofenol) y analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % en *buffer* TBE (Tris base, ácido bórico, EDTA) 0,5X. Los productos se separaron durante 50 min a 80 V y se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta, previa tinción con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio. Como marcador de peso molecular se empleó GeneRuler™ 50pb DNA Ladder (Fermentas). Las muestras que produjeron un producto específico de aproximadamente 800 pb fueron consideradas positivas para parásitos tripanosomatídeos.

RESULTADOS

Se identificaron 6 especies de *Lutzomyia* entre los 159 flebotomíneos recolectados: *Lu. evansi* ($n= 56$), *Lu. cayennensis cayennensis* (Floch y Abonnenc, 1941) ($n= 46$), *Lu. trinidadensis* (Newstead, 1922) ($n= 24$), *Lu. atroclavata* (Knab, 1913) ($n= 20$), *Lu. gomezi* (Nitzulescu, 1931) ($n= 2$), *Lu. dubitans* (Sherlock, 1962) ($n= 1$) y *Lutzomyia* spp ($n= 10$). *Lu. evansi* y *Lu. cayennensis cayennensis* representaron 64 % de los especímenes capturados, seguidos por *Lu. trinidadensis* y *Lu. atroclavata* con 15,1 y 12,6 %, respectivamente. En la electroforesis de los productos de la PCR obtenidos a partir de un grupo de 9 hembras de *Lu. cayennensis cayennensis* colectadas en la localidad de Flor del Monte, se visualizó una banda de aproximadamente

800 pb, que concordaba con la observada en el control positivo (fig.). Este hallazgo constituyó la primera evidencia molecular de infección natural de este flebotomíneo con parásitos tripanosomatídeos en la región de Los Montes de María.



Carriles 1 y 5: marcador de peso molecular (GeneRuler™ 50pb DNA Ladder); Carril 2: Control positivo de *Le. infantum*; Carril 3: Fragmento de ADN de aproximadamente 800 pb del gen de la pequeña subunidad ribosomal de la familia Trypanosomatidae amplificado en un grupo de 9 hembras de *Lu. cayennensis cayennensis* de Los Montes de María, Colombia; Carril 4: Control negativo.

Fig. Electroforesis de ADN en gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio.

DISCUSIÓN

Durante previos estudios entomológicos desarrollados en los departamentos de Córdoba, Tolima y Cundinamarca, se han colectado especímenes de *Lu. cayennensis cayennensis* infectados con promastigotes no identificados.^{15,16} Adicionalmente, este insecto fue hallado portando flagelados sin identificar en Venezuela.^{17,18} La presente investigación demuestra por primera vez para la región de Los Montes de María, la ocurrencia de parásitos tripanosomatídeos en *Lu. cayennensis cayennensis*.

Este flebotomíneo tiene una amplia distribución en Centroamérica y el norte de Sudamérica, se colecta comúnmente con *Lu. evansi* o *Lu. longipalpis* en focos de leishmaniosis visceral.^{19,20} A lo largo de su distribución se presume que se alimenta de vertebrados de sangre fría, en especial de lagartos.¹² Sin embargo, en Colombia se ha observado que *Lu. cayennensis cayennensis* en altas densidades ataca al humano y se encuentra con frecuencia reposando sobre las paredes en el interior de las viviendas.¹⁶ Este último patrón de

comportamiento se ha registrado en departamentos de la costa caribe como Córdoba, Sucre y Bolívar, donde se han colectado individuos en reposo intradomicilio (*Bejarano* y otros, datos no publicados). Adicionalmente, en Los Montes de María es una de las especies flebotomíneas más abundantes dentro del domicilio después de *Lu. evansi*.¹⁰

Llama la atención el hallazgo de tripanosomatídeos en *Lu. cayennensis cayennensis* a pesar del relativamente bajo número de flebotomíneos colectados, aunque *Travi* y otros¹⁵ habían registrado para esta especie en el foco de leishmaniosis de San Andrés de Sotavento, Córdoba, tasas de infección natural de 20 % con promastigotes no reconocidos.

A principios de los noventa, *Blanco-Tuirán* y otros²¹ identificaron el parásito causante de la leishmaniosis cutánea en Los Montes de María como *L. braziliensis*, mientras *Le Pape*¹⁰ confirmó a *L. infantum* como el agente etiológico de la forma visceral. Entre enero y abril de 2005 se registraron en el municipio de Ovejas 33 casos de leishmaniosis cutánea y 3 casos de leishmaniosis visceral. Aunque el vector de la forma visceral está plenamente determinado, se necesitan más estudios para identificar al transmisor de la leishmaniosis cutánea. Durante estas investigaciones se deberá establecer el género y la especie de tripanosomatídeo que infecta naturalmente la población de *Lu. cayennensis cayennensis* que habita la región, y si este flebotomíneo desempeña algún papel en el mantenimiento del ciclo de transmisión de la enfermedad.

Natural infection of *Lutzomyia cayennensis cayennensis* with trypanosomatid parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Los Montes de María, Colombia

SUMMARY

The presence of sand flies naturally infected with trypanosomatid parasites was determined in Los Montes de María, Colombia, a region considered endemic for visceral and cutaneous leishmaniasis. Phlebotomines were collected using CDC light-traps, and sticky traps soaked with castor oil placed in the peri and intradomestic habitats. Six species of *Lutzomyia* were morphologically identified among the 159 sand flies captured: *Lu. evansi*, *Lu. cayennensis cayennensis*, *Lu. trinidadensis*, *Lu. atroclavata*, *Lu. gomezi* and *Lu. dubitans*. A DNA band of 800 pb corresponding to the small-subunit ribosomal RNA gene (ssrRNA) of the family Trypanosomatidae was amplified in one pool of nine females of *Lu. cayennensis cayennensis*. This

finding constitutes the first evidence of natural infection of this sand fly species with trypanosomatid parasites in Los Montes de María.

Key words: *Lutzomyia cayennensis cayennensis*, Trypanosomatidae, parasitology, Colombia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zambrano P. Informe de leishmaniasis, Colombia semanas 1 a 52 de 2005. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2006;11(3):40-3.
2. Vélez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo SP. Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. *Cad Saúde Pública* 2001;17:171-80.
3. Young DG, Morales A, Kreutzer RD, Alexander JB, Corredor A, Tesh RB, et al. Isolations of *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from cryopreserved Colombian sand flies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1987;24:587-9.
4. Travi BL, Montoya J, Solarte Y, Lozano L, Jaramillo C. Leishmaniasis in Colombia. I. Studies on the phlebotomine fauna associated with endemic foci in the Pacific Coast region. *Am J Trop Med Hyg* 1988;39:261-6.
5. Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Morales A, Ferro C, Young DG, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:480-6.
6. 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;84:676-7.
7. 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;32:618-29.
8. Kreutzer RD, Corredor A, Grimaldi G Jr, Grogli M, Rowton ED, Young DG, et al. 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* 1991;44:662-75.
9. Santamaría E, Ponce N, Zipa Y, Ferro C. 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* 2006;26(Supl. 1):82-94.
10. Le Pape P. Écoépidémiologie de la leishmaniose a *Leishmania infantum* = *L. chagasi* dans la plaine des caraïbes (Colombie): corrélation vecteur et réservoir canin. Montpellier, Francia: Université de Montpellier I; 1992.
11. Camacho M, Caraballo LR, Barrios H, Correa I, Figueroa N. Kala-azar. Un foco en el departamento de Sucre. *Tribuna Médica* 1977;56:33-4.
12. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Amer Ent Inst* 1994;54:1-881.
13. Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehauffey PC, Besansky NJ, Finnerty V. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am J Trop Med Hyg* 1987;37:37-41.
14. Noyes HA, Camps AP, Chance ML. *Leishmania herrerii* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) is more closely related to *Endotrypanum* (Kinetoplastida; Trypanosomatidae) than to *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1996;80(1):119-23.

15. 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;33:278-85.
 16. Montoya-Lerma J, Ferro C. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. En: Amat G, Andrade MG, Fernández F, ed. *Insectos de Colombia*. Vol. 2. Colección Jorge Álvarez Lleras, No. 13. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Santafé de Bogotá, Colombia: Centro Editorial Javeriano; 1999. p. 211-45.
 17. Bonfante-Garrido R, Urdaneta R, Urdaneta I, Alvarado J, Perdomo R. Natural infection of *Lutzomyia rangelifera* (Ortiz, 1952) (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania* in Barquisimeto, Lara State, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:11.
 18. Rodríguez N, Aguilar CM, Barrios MA, Barker DC. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93:47-9.
 19. Ferro C, Morrison AC, Torres M, Pardo R, Wilson ML, Tesh RB. Species composition and relative abundance of sand flies of the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol* 1995;32:527-37.
 20. Travi BL, Adler GH, Lozano M, Cadena H, Montoya-Lerma J. Impact of habitat degradation on phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. *J Med Entomol* 2002;39:451-6.
 21. Blanco-Tuirán PJ, Maingon RDC, Hommel M, Alcalá JE. A focus of visceral and cutaneous leishmaniasis on the northern coast of Colombia. *Archs Inst Pasteur Tunis* 1993;70:481-8.
- Recibido: 4 de septiembre de 2006. Aprobado: 25 de octubre de 2006.
- Dr. Eduar E. Bejarano. Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre. Carrera 14 No. 16 B-32, A.A. 406, Sincelejo, Colombia. Teléf.: (575) 282 0830. Fax: (575) 282 1240. Correo electrónico: eduarelias@yahoo.com