

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

TIPIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *LUTZOMYIA* QUE  
ACTÚAN COMO POTENCIALES VECTORES DE  
*LEISHMANIA* SPP. EN LA PROVINCIA DE SALTA.

**María Cristina Almazán**

Licenciada en Ciencias Biológicas

Director: Dra. Paola Andrea Barroso

Co-director: Dr. Julio Rubén Nasser



Escuela de Posgrado de Facultad de Ciencias Naturales

Universidad Nacional de Salta

2019

## AGRADECIMIENTOS

A mis directores Dra. Paola Barroso y Dr. Julio Nasser, por su constante guía, acompañamiento, por contribuir a mi formación profesional a lo largo de estos años y por la paciencia infinita.

A los Dres. Diego Marco, José Gil y Rubén Cimino, por su generosidad e invaluable aportes tanto para mi crecimiento profesional como para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Linda Díaz Fernández, por estar siempre presente, por sus valiosos aportes y consejos.

A los miembros del Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicales, por la solidaridad y el compromiso de todos los días.

A los miembros del Instituto de Patología Experimental, por su colaboración. Especialmente al técnico Alejandro Uncos, con quien disfruté trabajar y sobre todo, aprender.

A mis compañeros de las cátedras Química Biológica y Zoología General, por la buena onda y el aliento de todos los días.

A los Lic. Carlos Hoyos, Inés López Quiroga y Noemí Copa. Mis amigos de trabajo de campo! Gracias por lograr que cada viaje sea único e inolvidable. Carlitos gracias por la generosidad en el trabajo diario, Inesita gracias por la alegría de todos los días y Noe gracias por la compañía de siempre, que este último tiempo fue fundamental para mí. Por más charlas y cenas, si es en la plaza de Orán, mejor.

A quienes alegran, matizan y agitan mis días! Mis amigos, los de siempre, Diego, Pauli y Dalmi que aunque los tiempos dificultan los encuentros, están siempre presentes. A los más nuevos, {Sabri (mi hermana), Pedrito, Thomi --> [Capotraste ♪]} y Agu. Gracias por los momentos compartidos, por la locura diaria y por el acompañamiento eterno. A Meli, por los años de amistad, por la ayuda y apoyo constante, por las risas de todos los días y por mucho más... gracias.

A quienes son mi mayor ejemplo y orgullo, a quienes adoro, mi familia. A mi papá, a mi mamá (gracias, gracias) y a mis hermanos Lau y Emi. Al hermoso Camilito que ilumina y alegra nuestros días. Gracias por estar presentes en cada uno de mis días, por la confianza, por el ánimo y por todo el amor.

## RESUMEN

La leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) es una enfermedad protozoaria causada por parásitos del género *Leishmania* que se transmiten a través de la picadura de flebótomos hembras. La LTA es endémica en diez provincias de Argentina, siendo el departamento de Orán la región más comprometida en la provincia de Salta (Salomón *et al.*, 2008, Krolewiecki *et al.*, 2017). La zona se caracteriza por la prevalencia de *Leishmania (Viannia) braziliensis* cuyo vector putativo es *Nyssomyia neivai*, la especie de flebótomos más abundante, y los reservorios se desconocen hasta el momento (Salomón *et al.*, 2004, Marco *et al.*, 2005).

El área de estudio de esta tesis fue el departamento de Orán. A lo largo de los años 2015, 2016 y 2017 se capturaron flebótomos en siete sitios periurbanos y rurales para búsqueda de infección natural, la tipificación molecular de flebótomos y parásitos y el estudio de la abundancia estacional de las especies capturadas.

Inicialmente, se analizó la variación estacional de las hembras capturadas en dos sitios periurbanos colindantes a parches de vegetación secundaria, emplazados en zonas con reporte de casos humanos de LTA. La abundancia media estacional de las hembras capturadas se analizó en forma conjunta con la variación mensual de casos de LTA diagnosticados en el Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (IIET) durante el periodo de muestreos entomológicos de esta tesis. Así se determinó la existencia de un intervalo de tiempo de aproximadamente 90 días entre los meses de gravidez de hembras y los meses en que se registra un mayor número de casos humanos.

A lo largo de esta tesis se buscó, principalmente, abordar molecularmente a los vectores potenciales de LTA que fueron capturados en sitios con riesgo de transmisión. Para esto, se normalizó y aplicó la combinación de PCR-RFLP del gen 18S ARN ribosomal (18S ARNr) para la tipificación molecular de hembras. Como resultado, las especies circulantes en los sitios de muestreo: *Nyssomyia neivai*, *Migonemyia migonei*, complejo

*cortelezzii* y *Psathyromyia shannoni* pudieron ser identificadas molecularmente; siendo la combinación PCR-RFLP 18S ARNr capaz de incluso identificar ejemplares que la metodología tradicional no había podido determinar por la ruptura de estructuras de valor taxonómico o por un montaje inadecuado. Los patrones de restricción obtenidos fueron especie-específicos y fueron validados por la identificación morfológica tradicional.

Por otra parte, 1.671 hembras fueron capturadas y analizadas molecularmente para la detección de ADN de *Leishmania* spp. Previamente, se puso a punto la PCR ADN kinetoplastídico (ADNk) para la búsqueda de material genético parasitario, con una sensibilidad de 25 promastigotes por flebótomo. Luego, esta fue combinada con PCR de Actina para que la resultante PCR dúplex ADNk-actina permita el análisis de pools de 10 hembras. Además, para tipificar y genotipificar la especie parasitaria en flebótomos, se estandarizó la PCR del gen de proteína heat shock 70 (hsp70) y PCR de citocromo b (cyt b) con cepas de *Leishmania* de referencia, aislados de pacientes con LTA y aislados de perros con leishmaniosis canina previamente tipificados.

Finalmente, para búsqueda tradicional de infección natural, 254 hembras fueron capturadas y diseccionadas para la observación microscópica de su contenido intestinal. Tanto las hembras analizadas por disección como aquellas analizadas molecularmente resultaron negativas para infección por *Leishmania* spp. lo que destaca la baja tasa de infección de los vectores de LTA y el carácter microfocal de la transmisión cuya dinámica depende principalmente de los reservorios, que se desconocen en la zona hasta el momento.

## ABSTRACT

The American tegumentary leishmaniasis (ATL) is a protozoan disease caused by parasites of the genus *Leishmania* that are transmitted through the bite of female sandflies. The ATL is endemic in ten provinces of Argentina, being the department of Orán the most affected region in the province of Salta (Salomón *et al.*, 2008, Krolewiecki *et al.*, 2017). The area is characterized by the prevalence of *Leishmania (Viannia) braziliensis* whose putative vector is *Nyssomyia neivai*, the most abundant sandfly species; the reservoirs are unknown until now (Salomón *et al.*, 2004, Marco *et al.*, 2005).

In this work, the captures of sandflies were undertaken in seven periurban and rural sites from the department of Oran in the years 2015, 2016 and 2017. Sandflies were analyzed with the purpose of searching natural infection, the molecular typing of sandflies and parasites, and to study the abundance of the species caught.

The seasonal variation of sand fly females that were captured in two periurban sites adjacent to patches of secondary vegetation was analyzed together with the monthly variation of ATL cases diagnosed at Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (IJET) since 1986. The highest number of ATL cases occurred in August, and this coincides with the peak of abundance of *Ny. neivai* from site 1. Instead, one of the abundance peaks of *Ny. neivai* from the site2 took place in June; the gap between abundance of sandflies and peak of patients, could be attributed to the incubation period of the disease and the time of evolution of the lesions that have the patients.

In addition, the combination of PCR-RFLP of the 18S RNA ribosomal RNA (18S rRNA) was standardized to typify the sandflies molecularly. As a result, all the circulating species in the sampling sites: *Nyssomyia neivai*, *Migonemyia migonei*, complex *cortelezzii* and *Psathyromyia shannoni* could be identified successfully. The restriction patterns obtained were species-specific and were validated by traditional morphology. Also, the techniques were able to identify specimens that the traditional methodology could not determine due to the rupture of structures of taxonomic value.

On the other hand, 1671 females were captured and analyzed molecularly for the detection of *Leishmania* spp DNA. Previously, a PCR based on kinetoplast DNA (DNAk) was standardized, and its sensitivity was 25 promastigotes per sand fly. Then, the PCR DNAk was combined with PCR actin, the resulting duplex PCR DNAk-actin allows the analysis of pools of 10 females. Moreover, to tipify and genotype the parasitic species in sandflies, the heat shock 70 protein gene (hsp70) and cytochrome b (cyt b) PCR were standardized with reference *Leishmania* strains, isolated from ATL patients and isolates from dogs with canine leishmaniosis previously typified.

Finally, 254 females were captured and dissected for detecting natural infection through the microscopic observation of their guts. Both the females analyzed by dissection and those analyzed molecularly were negative for infection by *Leishmania* spp. which highlights the low infection rate of vectors and the microfocal character of ATL transmission whose dynamics depends mainly on the reservoirs, which are unknown in the area until now.

# ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9
1.1 Definición .....	9
1.2 Situación de las leishmaniasis .....	9
1.3 Agentes etiológicos .....	10
1.4 Vectores .....	11
1.5 Reservorios.....	13
1.6 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	14
1.7 Manifestaciones Clínicas .....	16
Leishmaniasis Cutánea Localizada y Múltiple: .....	17
Leishmaniasis Cutánea Difusa: .....	17
Leishmaniasis Mucocutánea: .....	17
Leishmaniasis Visceral:.....	18
1.8 Métodos de Diagnóstico .....	18
ÁREA DE ESTUDIO .....	19
OBJETIVO GENERAL.....	21
CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE LA VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA ABUNDANCIA DE FLEBÓTOMOS JUNTO CON LA VARIACIÓN MENSUAL DE CASOS DE LTA. ....	23
INTRODUCCIÓN .....	24
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
RESULTADOS .....	31
DISCUSIÓN.....	39
CAPÍTULO 3: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE FLEBÓTOMOS A TRAVÉS DE PCR-RFLP DEL GEN 18S ARNr. ....	43
INTRODUCCIÓN .....	44
OBJETIVOS.....	45
MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
RESULTADOS .....	51
DISCUSIÓN.....	58
CAPÍTULO 4: BÚSQUEDA DE INFECCIÓN POR <i>LEISHMANIA</i> SPP. EN FLEBÓTOMOS.....	63
INTRODUCCIÓN.....	64
OBJETIVOS.....	66

MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
RESULTADOS .....	77
DISCUSIÓN.....	84
CAPÍTULO 5: ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES PARA TIPIFICACIÓN DE <i>LEISHMANIA SPP.</i> .....	91
INTRODUCCIÓN .....	92
OBJETIVOS .....	93
MATERIALES Y MÉTODOS.....	94
RESULTADOS .....	96
DISCUSIÓN.....	102
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES .....	104
ANEXO I .....	109
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	111

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1 Definición

El término leishmaniasis se utiliza para denominar a un conjunto de manifestaciones clínicas producidas por diferentes agentes etiológicos, todos ellos parásitos tripanosomatídeos pertenecientes al género *Leishmania* (Grimaldi & Tesh, 1993). Los parásitos son transmitidos por la picadura de insectos hematófagos, conocidos como flebótomos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) (Killick-Kendrick, 1990).

De acuerdo al rol del ser humano en el ciclo de transmisión de las leishmaniasis, éstas se clasifican en leishmaniasis zoonóticas, en las cuales los reservorios son animales silvestres o domésticos y en leishmaniasis antroponóticas, en las cuales el reservorio es el ser humano (WHO, 2014).

### 1.2 Situación de las leishmaniasis

Las leishmaniasis son endémicas en 98 países y afectan principalmente a poblaciones mundiales de bajos recursos económicos (Bruschi & Gradoni, 2018). Se ha estimado que existen 350 millones de personas en riesgo y que la incidencia anual global es de medio millón de casos para la forma visceral y 1,5 a 2 millones de casos para las formas cutáneas (Desjeux, 2004).

En Argentina la leishmaniasis americana tegumentaria (LTA) es endémica en diez provincias y el registro de casos humanos se remonta a comienzos del siglo XX. La incidencia de la LTA aumentó significativamente durante la década de los 80', mientras que los *primeros* casos humanos de leishmaniasis visceral se diagnosticaron recién en el 2006 (Salomón *et al.*, 2008c, 2012).

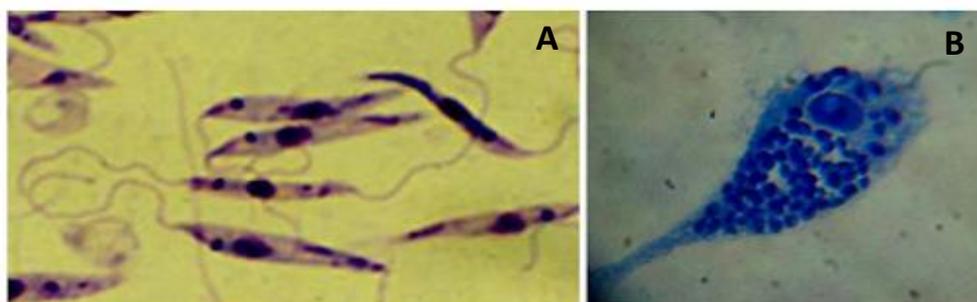
Hasta la década de los años 80, los casos de LTA estuvieron por lo general aislados en tiempo y espacio, con un reporte anual de entre 40 y 90 casos en todo el país. Sin embargo, desde 1985 se registraron brotes con una incidencia de hasta 900 casos. El último año epidémico fue el 2002 con 748 casos y desde entonces tiene lugar un periodo inter-epidémico con focos más escasos (150-370 casos registrados) en las provincias endémicas (Salomón *et al.*, 2008b, 2012; Sosa-Estani *et al.*, 2000).

### 1.3 Agentes etiológicos

Se trata de protozoos parásitos del género *Leishmania* (Clase Kinetoplastida, Orden Trypanosomatida, Familia Trypanosomatidae) (Bruschi & Gradoni, 2018). Son dimórficos, a lo largo de su ciclo vital adoptan dos conformaciones morfológicas diferentes: una forma intracelular llamada amastigote que carece de flagelo y puede visualizarse dentro de las células de los hospedadores vertebrados; y una forma extracelular llamada promastigote que es flagelada y puede encontrarse en el tubo digestivo de los vectores (Figura 1) (Cuba, 2000).

Tradicionalmente, el género *Leishmania* se subdividía en dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*, de acuerdo a la región del tubo digestivo del vector donde los parásitos se desarrollan (Bates, 2007; Kamhawi, 2006). Actualmente se considera que existen también los subgéneros *Mundinia* y *Sauroleishmania*, siendo el último exclusivo de reptiles (Espinosa *et al.*, 2016).

En Argentina, cuatro especies de *Leishmania* fueron identificadas como agente causal de LTA, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (Marco *et al.*, 2005), *L. (Leishmania) amazonensis* (Barrio *et al.*, 2009; Frank *et al.*, 2003), *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (Marco *et al.*, 2006) y *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* (Marco *et al.*, 2012). La especie *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* se encontró recientemente en casos de leishmaniasis visceral (Barrio *et al.*, 2012; Barroso *et al.*, 2015a) y de leishmaniosis canina (Barroso *et al.*, 2015b). De estas, *L. (V.) braziliensis* es la especie de mayor prevalencia en la provincia de Salta (Locatelli *et al.*, 2014).



**Figura 1:** A: Promastigotes de *L. (L.) amazonensis*. 1000X B: Amastigotes infectantes en macrófago. 1000X. Santos *et al.*, 2008.

## 1.4 Vectores

Los flebótomos son insectos pequeños que miden entre 2 y 3 mm y pertenecen al orden Díptera, familia Psychodidae y subfamilia Phlebotominae (Killick-Kendrick, 1990). Estos insectos también están asociados a la transmisión de otros patógenos como Phlebovirus, Orbivirus y Vesiculovirus (Depaquit *et al.*, 2010) y la bacteria *Bartonella bacilliformis* (Herrer & Christensen, 1975; Chamberlin *et al.*, 2002).

A pesar de su conspicuo tamaño, presentan características que permiten y facilitan su identificación: tienen el cuerpo y las alas densamente cubiertos de pelos, la cabeza forma un ángulo de 90° con el eje del tórax y cuando se posan sobre una superficie sus alas se disponen de manera erecta en forma de V (Figura 2). Además, durante el desplazamiento hasta la fuente de alimento su vuelo parece consistir en pequeños saltos (Killick-Kendrick, 1999) lo que explica por qué no suelen dispersarse muy lejos de donde se alimentaron (Ready, 2013). La actividad de estos insectos es crepuscular o nocturna y sus sitios de descanso son fríos y húmedos, por ejemplo, letrinas, gallineros, hojarascas, huecos de árboles y cuevas de roedores u otros mamíferos.



**Figura 2:** Flebótomo posado.

Fuente: <https://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/>

Los flebótomos adultos se alimentan de los azúcares de flores y frutos. Las hembras, además, son hematófagas ya que la sangre permite el desarrollo

de los huevos. El número de ingestas de sangre durante un ciclo gonotrófico varía según la especie de flebótomos, algunas ingieren sangre más de una vez en días diferentes mientras que otras sólo tienen una ingesta por cada ovoposición (Killick-Kendrick, 1990). Por esta característica, las hembras intervienen en la transmisión de la *Leishmania* spp., siendo que un mayor número de ingestas aumenta la probabilidad de contacto vector-vertebrado.

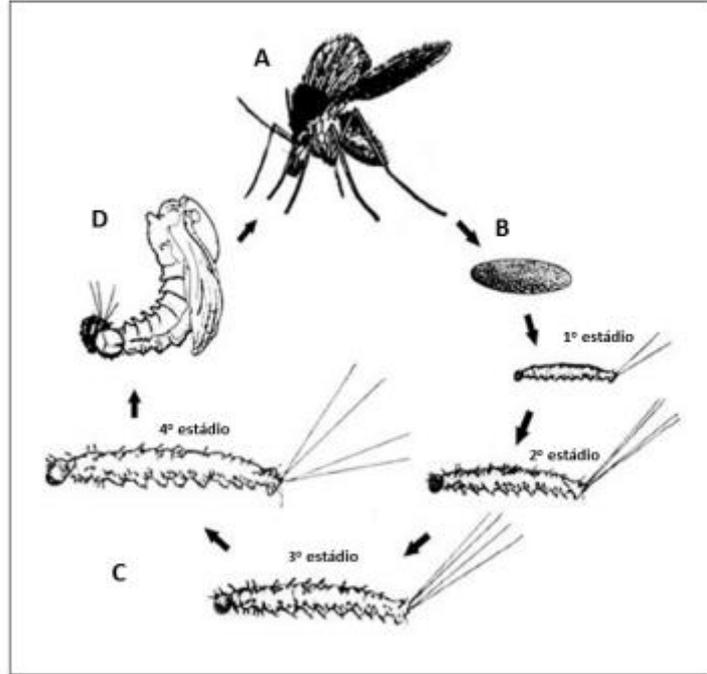
El ciclo biológico de los flebótomos varía según las especies, comprendiendo los siguientes estadios (Figura 3) (Killick-Kendrick, 1990):

**Huevo:** Son alargados, ovalados y de color que varía de castaño claro a oscuro. Miden entre 300 y 500  $\mu\text{m}$  con crestas u otras protuberancias dando lugar a patrones característicos de las especies o complejos. La hembra coloca los huevos generalmente aislados o adheridos en el sustrato de forma agrupada, tanto en tierra húmeda como en materia orgánica, a la sombra. El desarrollo del embrión dura 4-20 días en condiciones favorables, hay algunas especies que pueden tener una latencia de hasta 160 días en condiciones adversas.

**Larva:** son terrestres y mudan tres veces (larva I a larva IV). Las mismas se desarrollan durante 20 a 40 días y se desplazan dentro del sustrato. Finalmente se fijan al sustrato para mudar a pupa.

**Pupa:** La larva de cuarto estadio en un lugar más seco del que ocupaba inicialmente, se transforma en pupa, que es de 2 mm aproximadamente, forma cilíndrica, y mantiene una posición erecta al fijarse al sustrato por la parte posterior, su color varía de blanco a pardo oscuro. En condiciones favorables, este período varía 8 a 14 días.

**Adulto:** Los machos suelen emerger antes que las hembras. En el transcurso de las primeras 24 horas, los genitales externos masculinos giran 180°, por lo que adquieren una posición invertida permanente. El período de vida del adulto en condiciones de laboratorio es de 20 a 35 días; en la naturaleza, no se conoce con exactitud.



**Figura 3:** Ciclo de vida del flebótomo.

Fuente: (<http://www.infectionlandscapes.org/2011>).

### 1.5 Reservorios

Dentro de los reservorios descritos hasta el momento para *Leishmania* spp. se encuentran roedores, edentados, marsupiales, cánidos y primates no humanos (Grimaldi & Tesh, 1993; Ashford, 1996). Como reservorio principal de *L. (L.) infantum*, agente causal de la leishmaniasis visceral se identificó al perro doméstico (*Canis familiaris*), especialmente en ambientes con transmisión doméstica (Grimaldi & Tesh, 1993).

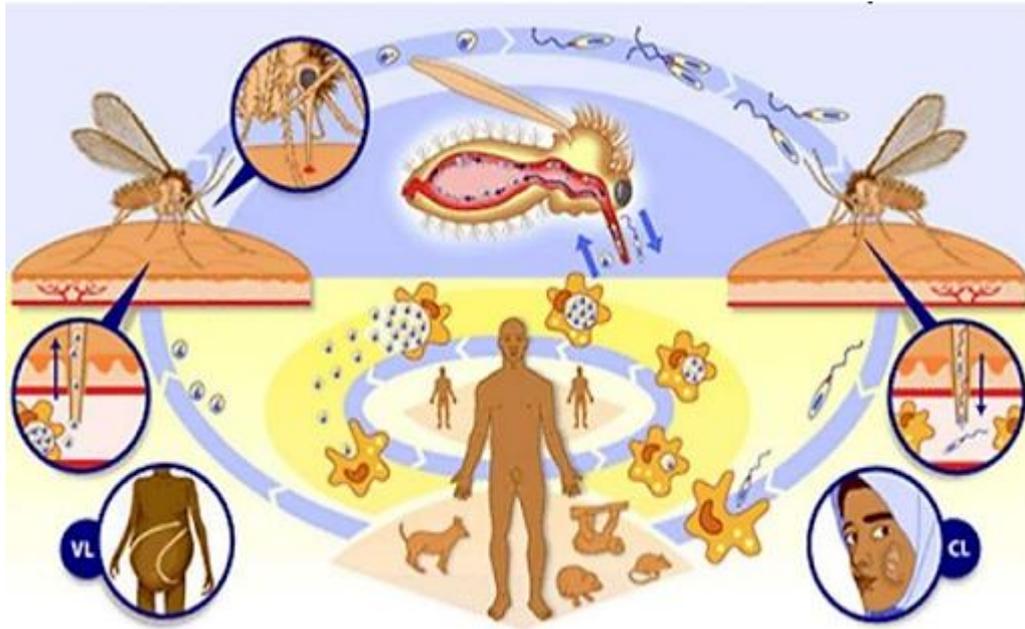
Para el caso de las *Leishmania* spp. causantes en América de las leishmaniasis cutáneas, el o los reservorios todavía no fueron determinados con certeza, siendo el hombre un hospedador accidental de esta. Ashford, 1996, menciona para el nuevo mundo a los edentados de los géneros *Choloepus* y *Bradypus*, y a los roedores *Otodylomys phyllotis*, *Neotoma micropus*, *Proechimys* spp. y *Cuniculus paca* como posibles reservorios. Asimismo, se encontraron en distintos puntos de América roedores de los géneros *Oryzomys*, *Olygorizomys*, *Akodon* y la especie *Ratus ratus* (De Lima *et al.*, 2002; Kerr *et al.*, 2006; Telleria *et al.*, 1999) infectados con *Leishmania* spp.

## **1.6 Ciclo de vida de *Leishmania* spp.**

En el vector se encuentra la forma promastigote de *Leishmania* spp., los parásitos se transmiten a los reservorios mediante la picadura de los flebótomos hembras. Al picar, el vector inocular con la saliva entre 10 y 200 promastigotes en la dermis.

En los reservorios, los promastigotes son fagocitados por los macrófagos de la piel, en su interior se forma una vacuola parasitófora la cual al fusionarse con lisosomas da lugar a los fagolisosomas. Dentro de los fagolisosomas los promastigotes se transforman en amastigotes que se multiplican hasta producir la lisis de las células en las que se encuentran, al liberarse invaden otros macrófagos que fueron atraídos al sitio de infección.

Cuando un vector se alimenta nuevamente de un reservorio, ingiere células infectadas con amastigotes. En el intestino del vector las células se desintegran liberando amastigotes que se transforman en promastigotes. Éstos, luego de multiplicarse activamente, migran a las glándulas salivales del vector, y así serán inoculados en la próxima ingesta del flebótomo (Figura 4).

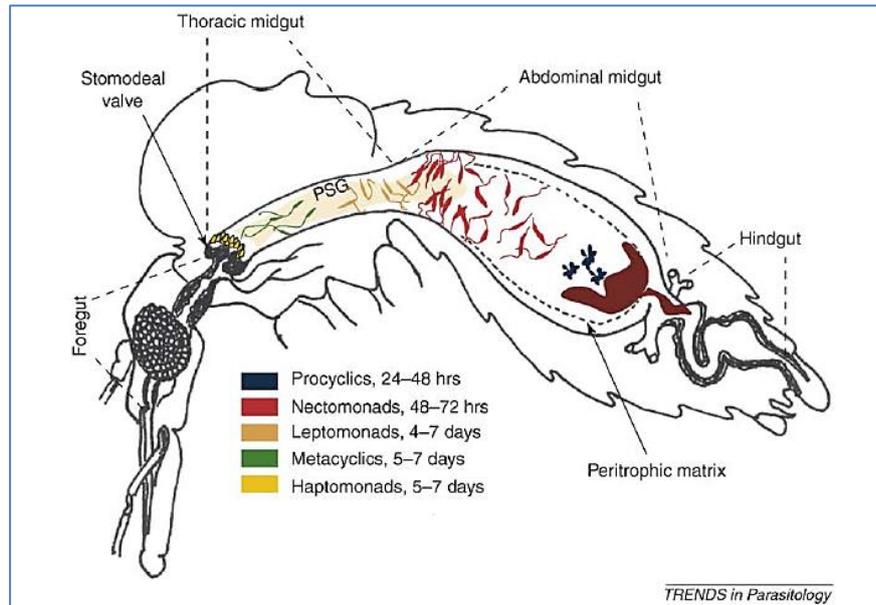


**Figura 4:** Ciclo de vida de *leishmania* spp.

Fuente: [http://ojocientifico.blogspot.com.ar/2010\\_12\\_01\\_archive.html](http://ojocientifico.blogspot.com.ar/2010_12_01_archive.html)

Por razones didácticas, se considera que en el tubo digestivo del vector los parásitos se transforman de amastigotes a promastigotes. Sin embargo, el proceso de diferenciación que atraviesan es mucho más complejo (Bates, 2007; Kamhawi, 2006). Los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, debilmente móviles, que son la forma replicativa en el coágulo de sangre. Esto ocurre dentro de la matriz peritrófica, una cubierta proteica y de quitina producida por el epitelio intestinal para encerrar la sangre que se está digiriendo. Al cabo de unos días, la división de los parásitos decrece y éstos se transforman en promastigotes nectomónados, forma móvil. Los nectomónados se acumulan en la parte terminal anterior de la matriz peritrófica y pueden salirse de ella, el escape está mediado por quitinasas; migran por la parte anterior del intestino medio, algunos adhiriendose al *microvilli* del epitelio, hasta que llegan a la válvula estomodeal. Los nectomónados determinan el establecimiento de la fase de infección, que marca la persistencia parasitaria en un vector luego de la digestión sanguínea.

Cuando alcanzan la válvula estomodeal, los nectomónados se transforman en promastigotes leptomónados, formas más cortas que reaundan la división celular y secretan el gel PSG. Algunos nectomónados/leptomónados pueden adherirse a la superficie de la válvula trasformandose en promastigotes haptomónados. Finalmente algunos leptomónados se diferencian en promastigotes metacíclicos, la fase infectiva, depositada en la próxima ingesta (Figura 5).



**Figura 5:** Desarrollo de parásitos de *Leshmania* spp. en el intestino de un vector. (Kamhawi, 2006).

### 1.7 Manifestaciones Clínicas

Las leishmaniasis se caracterizan por presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas: una o más lesiones cutáneas ulcerativas desarrolladas en el sitio de picadura del vector (leishmaniasis cutánea localizada y leishmaniasis cutánea múltiple), múltiples nódulos no ulcerativos (leishmaniasis cutánea difusa), inflamaciones mucosas deformantes (leishmaniasis mucocutánea) e infecciones viscerales (leishmaniasis visceral) (Reithinger *et al.*, 2007). Las formas cutáneas y mucocutáneas se agrupan como LTA (Grimaldi & Tesh, 1993).

**Leishmaniasis Cutánea Localizada y Múltiple:** Se trata de úlceras generadas en la zona dérmica donde el vector picó. Las úlceras son precedidas por máculas que duran uno o dos días. Luego las máculas evolucionan a pápulas que finalmente se ulceran. La úlcera típica presenta fondo limpio, color rosado; es redonda u ovalada de bordes regulares y elevados, es indolora y de base indurada (Figura 6) (Reithinger *et al.*, 2007).



**Figura 6:** Úlcera de Leishmaniasis Cutánea Localizada. Fotografía perteneciente al archivo fotográfico del Instituto de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (IIET).

**Leishmaniasis Cutánea Difusa:** Se caracteriza por la presencia de abundantes nódulos ricos en parásitos. Inicialmente se manifiesta como pápulas o placas localizadas en un segmento de la superficie corporal pero en unos pocos meses puede extenderse a otras partes del tegumento (Reithinger *et al.*, 2007).

**Leishmaniasis Mucocutánea:** Este tipo de leishmaniasis se origina en las mucosas del tracto superior de las vías respiratorias y/o digestivas por una metástasis por vía hematológica o linfática de una lesión cutánea distante o por la extensión a mucosas de leishmaniasis cutánea en cara. Por lo general se presenta varios meses o incluso años después de haber cicatrizado la forma cutánea. Aunque también puede presentarse en forma simultánea con las lesiones cutáneas y en algunos casos no hay evidencias de cicatrices previas. Las formas mucocutáneas pueden progresar provocando graves destrucciones y mutilaciones que afectan de mayor manera la calidad de vida del paciente (Figura 7) (Reithinger *et al.*, 2007).



**Figura 7:** Leishmaniasis Mucocutánea. Fotografía perteneciente al archivo fotográfico del IJET.

**Leishmaniasis Visceral:** En las formas viscerales hay inflamación de hígado y bazo, acompañada por distensión abdominal severa.

### ***1.8 Métodos de Diagnóstico***

Los métodos de diagnóstico directo que permiten la visualización del parásito infectante, incluyen las técnicas histopatológicas que consisten en la visualización microscópica de amastigotes a través de biopsias o frotis teñidos con Giemsa y los métodos de cultivo que permiten el crecimiento y observación de promastigotes (Cuba Cuba, 2000).

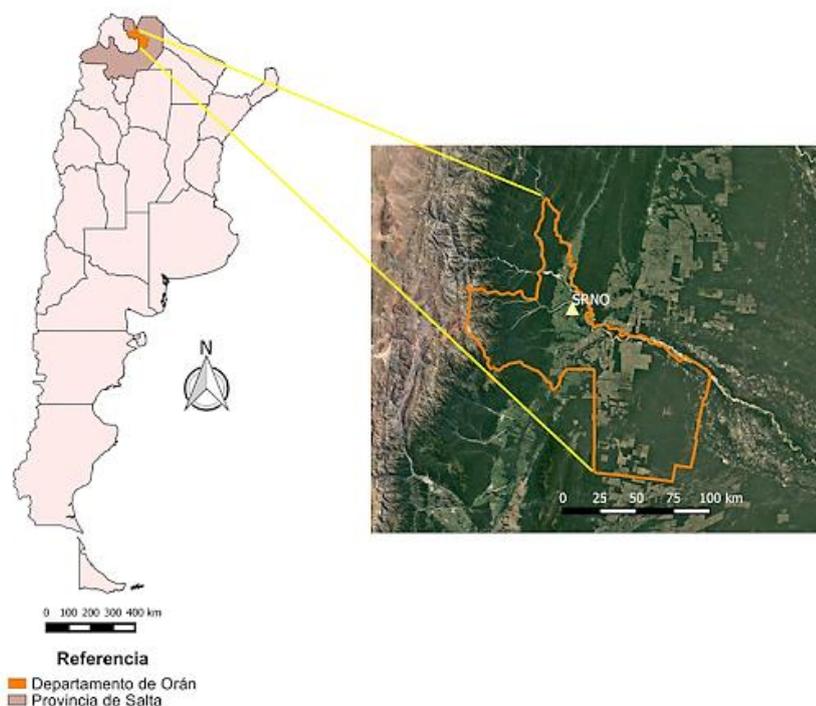
Algunas de las técnicas de diagnóstico indirecto más usadas son Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), que se basan en la detección de anticuerpos específicos anti-*Leishmania*. En los últimos tiempos, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido ampliamente empleada para el diagnóstico basado en la detección de ADN parasitario, debido a su alta sensibilidad y especificidad (Bensoussan *et al.*, 2006).

Por último, la Intradermorreacción de Montenegro (IDRM) es una prueba inmunológica de hipersensibilidad retardada que permite complementar el diagnóstico en zonas endémicas y ser resultar económica y efectiva con elevada sensibilidad y especificidad (Krolewiecki *et al.*, 2017).

# ÁREA DE ESTUDIO

Esta tesis se desarrolló en el departamento de Orán, zona endémica de LTA, que se encuentra en el sector central del extremo norte de la provincia de Salta (Figura 8). Según el Censo Nacional de 2010 la población es de 138.018 habitantes.

La cabecera del Dpto. es la ciudad de San Ramón de la Nueva Orán (SRNO) que se encuentra a  $23^{\circ} 08' S$ ;  $64^{\circ} 20' W$ , 270 km al noreste de la ciudad de Salta y 46 kilómetros del sur de la frontera con Bolivia. Este área de la precordillera andina está clasificada como región subtropical húmeda ubicada en la región fitogeográfica de las Yungas donde la temperatura media anual es de  $24,1^{\circ}$  y el promedio anual de precipitaciones es de 734 mm, con un máximo en enero y un mínimo entre junio y agosto, siendo el trimestre más lluvioso el de diciembre a febrero; prolongándose en los últimos años a los meses de marzo y abril. Los sitios de transmisión se determinaron a partir del análisis de la base de datos del Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (IJET) de la ciudad de Orán, en donde se registran datos demográficos, clínicos y de laboratorio de los pacientes diagnosticados.



**Figura 8:** Área de estudio, departamento de Orán, provincia de Salta.

# **OBJETIVO GENERAL**

En la provincia de Salta, la zona endémica de leishmaniasis cutánea y mucocutánea comprende el departamento de Orán y San Martín en donde *L. (V.) braziliensis* es la especie prevalente. Hasta el momento no se ha atribuido, de manera certera, a ninguna especie de flebótomo su responsabilidad como vector de este parásito. Por lo tanto el objetivo general de este trabajo fue tipificar molecularmente a los vectores potenciales que circulan en el departamento de Orán y determinar su rol en la transmisión de *Leishmania* spp. a través de la búsqueda de infección natural.

**CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE LA  
VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA  
ABUNDANCIA DE FLEBÓTOMOS  
JUNTO CON LA VARIACIÓN  
MENSUAL DE CASOS DE LTA.**

## **INTRODUCCIÓN**

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades humanas causadas por parásitos del género *Leishmania*. Aunque tienen una larga historia, con casos descritos hace 2500 años a.C (Akhoundi *et al.*, 2016), las leishmaniasis son todavía una de las enfermedades protozoarias desatendidas de mayor importancia médica (Fenwick, 2012).

El aumento de los factores de riesgo ha convertido a la leishmaniasis en un verdadero problema de salud pública en varios países del mundo. Tradicionalmente, los estudios para determinar los factores de riesgo de LTA estuvieron dirigidos a jóvenes y adultos y desde entonces se la considera una enfermedad ocupacional ya que está asociada principalmente al sexo masculino en edad productiva siendo las tareas agrícolas, de explotación forestal, la caza, la pesca, el trabajo en lavaderos de oro, entre otras, actividades de alto riesgo (Ampuero *et al.*, 2005; Pedrosa & Ximenes, 2009). Sin embargo, diferentes procesos sociales como obras de desarrollo (construcción de carreteras, represas, gasoductos), deforestación, migración y urbanización no planificada también (Desjeux, 2001a; Salomón & Quintana, 2011), al igual que actividades recreativas como bañarse en el río, acampar en bosques, pescar y cazar (Sosa-Estani *et al.*, 2001; Yadon *et al.*, 2003) han sido también asociados con brotes epidémicos.

Así, la LTA presenta diferentes patrones de transmisión, siendo el más frecuente el de ciclo y transmisión silvestre producto de tareas llevadas a cabo en vegetación poco modificada; el sexo y la edad de los casos depende de la actividad de riesgo. También, tiene lugar el patrón de ciclo silvestre con transmisión peridoméstica, ya sea por contigüidad espacial de las viviendas con vegetación residual o bien por alteración de la vegetación cercana a las viviendas, lo que genera la migración de vectores y reservorios. En este escenario la proporción de casos de sexo femenino y menores de 15 años manifiesta el componente peridoméstico de la transmisión. Finalmente, aunque menos frecuente, tanto el ciclo como la transmisión pueden ser peridomésticos, siendo las características de los casos similares a las del escenario anterior pero con una distribución de flebotomos restringida al ambiente peridoméstico (Salomón *et al.*, 2006; Salomón *et al.*, 2008a).

La leishmaniasis son endémicas en 98 países con una incidencia anual de 1,5 millones de casos para las formas cutáneas y medio millón para la forma visceral (Karimkhani *et al.*, 2016; Bruschi & Gradoni, 2018). Se estima que 350 millones de personas están riesgo y que la prevalencia de este conjunto de enfermedades es de 12 millones de casos (Desjeux, 2001b).

En Argentina, la LTA es endémica en diez provincias, siendo la más afectada la de Salta en la cual tuvo lugar tanto el *primer* brote del país en los años 1984-1985, como así también el mayor brote con hasta 900 casos humanos en 1998 (Salomón *et al.*, 2012, 2001; Sosa-Estani *et al.*, 2000). Los departamentos de Orán y San Martín constituyen un área hiperendémica donde se reportan el 53% de los casos argentinos de LTA (Salomón *et al.*, 2008); en un análisis retrospectivo de casos con evaluación diagnóstica de laboratorio y datos demográficos entre los años 2006 y 2015 se incluyeron 733 casos del ILET, de los cuales el 91% perteneció al departamento de Orán, Salta. De estos, el 64.7% (473/733) tuvo frotis positivo para leishmaniasis y el 6.8% (50/773) presentó compromiso mucoso (Krolewiecki *et al.*, 2017).

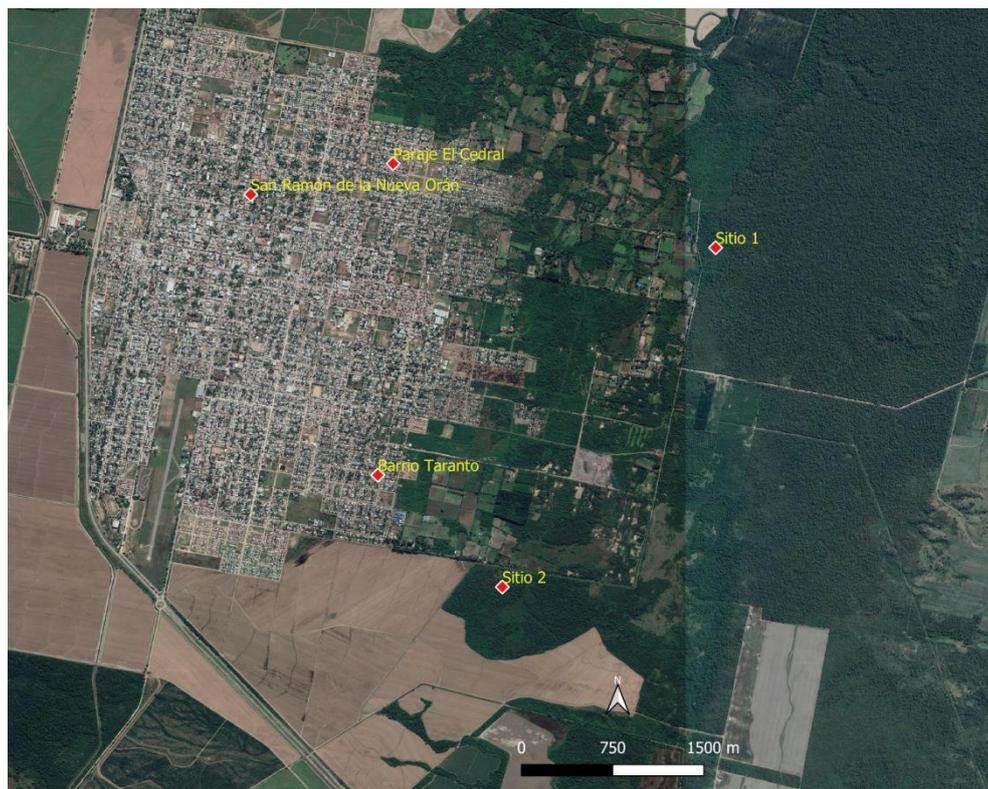
Los brotes epidémicos ocurren por la combinación de factores climáticos, biológicos y antropológicos, responsables de incrementar el contacto efectivo vector-humano. Por lo tanto, es importante estudiar en profundidad las zonas endémicas teniendo en cuenta sus características ecológicas y ambientales, la abundancia y distribución de flebótomos y las características socioculturales de la población en riesgo para diseñar las medidas de prevención y control pertinentes.

## **OBJETIVOS**

- ✓ Analizar la variación estacional de la abundancia de diferentes especies de flebótomos en sitios periurbanos de la ciudad de Orán asociados a parches de vegetación secundaria.
- ✓ Comparar la variación estacional de la abundancia de diferentes especies de flebótomos hembras con la variación mensual de casos de LTA de pacientes que residan en Orán.

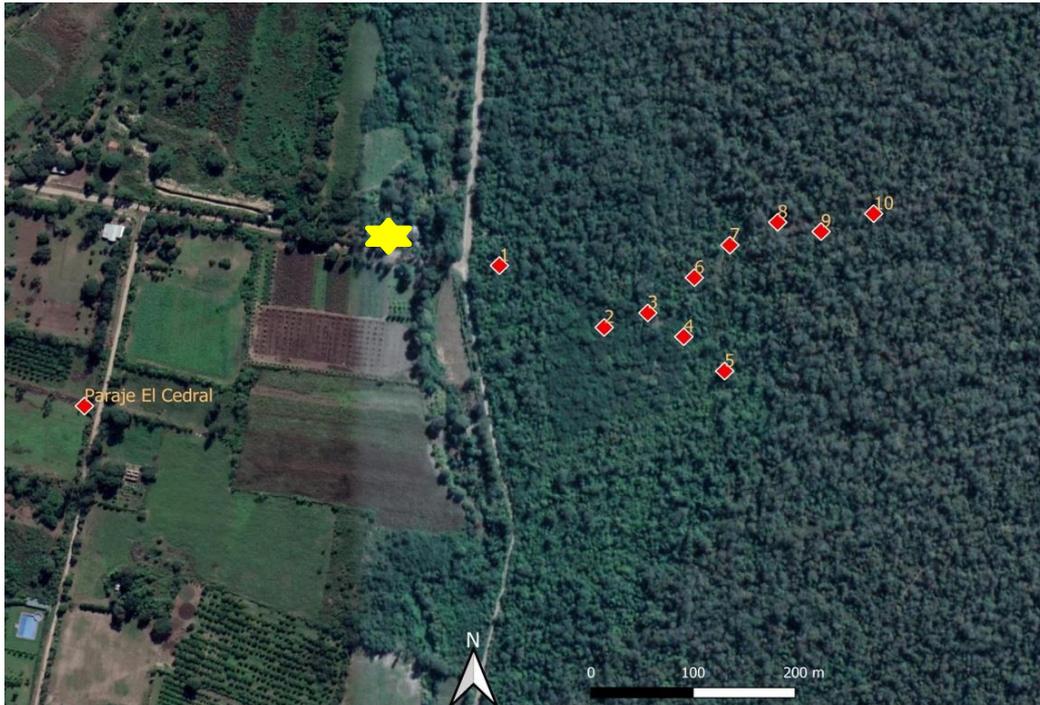
## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Captura de flebótomos:** Los muestreos se llevaron a cabo en dos sitios periurbanos de la ciudad de Orán. Ambos sitios fueron seleccionados ya que previamente se habían reportado casos humanos de LTA provenientes de esa área (Figura 9).



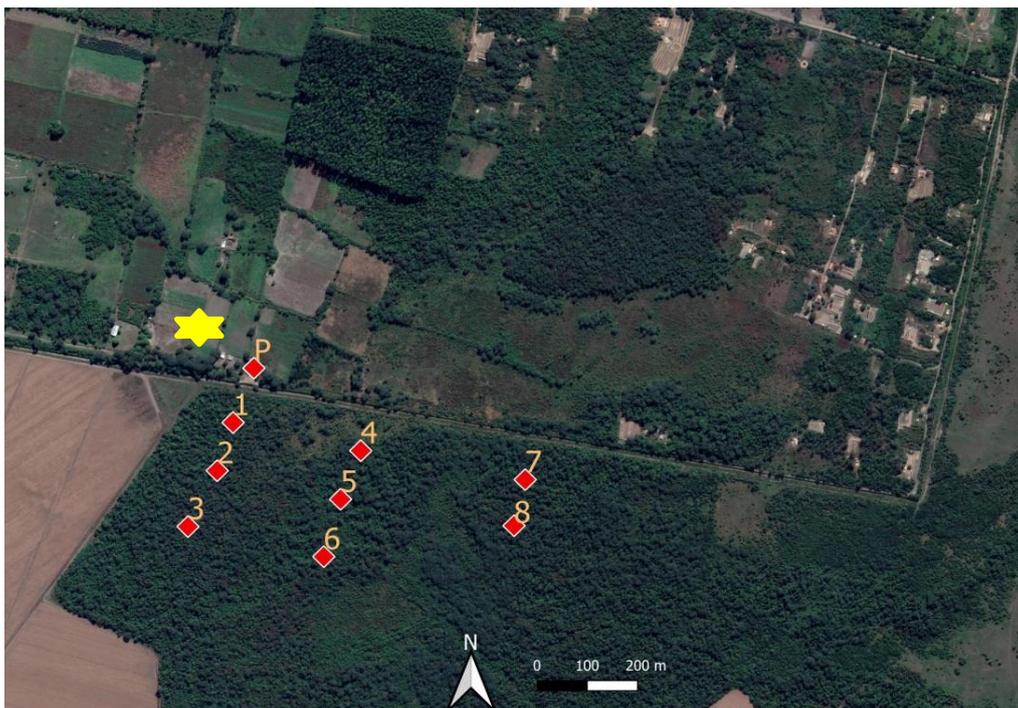
**Figura 9:** Sitios de muestreo 1 y 2, SRNO.

El sitio 1 ( $23^{\circ} 8'0.43''S$ ,  $64^{\circ}17'4.13''O$ ) colinda con el paraje El Cedral y es un parche de vegetación secundaria situado en el sector noroeste de SRNO. Las capturas se llevaron a cabo durante el 2016 en los meses de marzo, mayo, julio, agosto, septiembre, noviembre y diciembre, una noche por mes y usando 10 trampas de tipo CDC dispuestas a 30 metros una de otra, en cercanía a las viviendas (Figura 10).



**Figura 10:** Puntos de muestreo con trampas CDC en sitio 1, El Cedral.  Reporte de casos humanos de LTA.

El sitio 2 ( $23^{\circ} 9'39.21''S$ ,  $64^{\circ}18'5.79''O$ ) se sitúa en cercanías al barrio Néstor Taranto, y es un parche de vegetación secundaria correspondiente a selva pedemontana, en la periferia de SRNO. Se realizaron muestreos bimestrales entre el mes de diciembre de 2016 y noviembre de 2017 dos o tres noches por mes con 8 trampas de tipo CDC dispuestas entre sí a 50 m a lo largo de tres transectas de 150 m y una trampa CDC en peridomicilio (Figura11). Para mayor detalle, ir a ANEXO I.



**Figura 11:** Puntos de muestreo con trampas CDC en el sitio 2, N. Taranto. P: Trampa de peridomicilio. 🌟 Reporte de casos humanos de LTA.

Las trampas CDC (Center for Disease Control), utilizan como atrayente una fuente de luz que está asociada a una hélice cuyo movimiento aspira los insectos hacia un recipiente colector (Figura 12). Estas se colocaron a 1,5 m sobre el suelo de 19 a 7 hs y los flebótomos capturados fueron separados por sexo y conservados en etanol al 70% hasta que se procesaron. Como se detalla en el capítulo 3, los flebótomos fueron identificados por morfología a través de la observación de cibario y espermateca en hembras y genitalia externa en machos, como así también a través de PCR-RFLP del gen 18S ARNr para tipificación molecular de flebótomos. Para los análisis de este capítulo, de los flebótomos capturados en el sitio 1, sólo se trabajó con las hembras.

**Identificación de flebótomos:** Los machos fueron clarificados con hidróxido de potasio al 10% durante 24 hs. Luego, se les agregó ácido acético con fines de neutralización. Posteriormente, se realizaron lavados con agua destilada y finalmente se deshidrataron con una serie de alcoholes de concentración creciente (70°, 80°, 90°, 96° y absoluto). Se almacenaron en creosota vegetal (un mínimo de 24hs) hasta el montaje con Bálsamo de

Cánada. Como las hembras fueron luego analizadas molecularmente (Capítulos 3 y 4), sólo se clarificaron con lactofenol durante al menos 72 hs y posteriormente se montaron con Bálsamo de Cánada. La identificación se basó en la observación de cibario y espermateca de hembras y genitalia externa en machos siguiendo las claves morfológicas de Young & Duncan, 1994 y Galati, 2003, usando la nomenclatura propuesta por Marcondes, 2007. Cabe destacar, que como se detallará en el capítulo 3, el 60% de las hembras del sitio 2; N. Taranto, fue identificado mediante PCR-RFLP. Para los análisis de este capítulo, de los flebótomos capturados en el sitio 1, sólo se consideraron las hembras.



**Figura 12:** Trampa de luz CDC para captura pasiva de insectos.

**Casos humanos de LTA:** Se trabajó con la base de datos del Instituto de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (IINET), derivados mayoritariamente por médicos del sector público que requirieron diagnóstico diferencial de LTA para pacientes de Orán y regiones aledañas.

Se incluyeron 2630 casos con frotis positivo para LTA que fueron diagnosticados desde noviembre de 1985 hasta noviembre de 2018. Las variables consideradas fueron sexo, edad y el tiempo de evolución de la lesión (edad) que se determinó a partir de lo establecido por los pacientes en la

anamnesis. El diagnóstico se llevó a cabo en el IIET, en donde las lesiones de pacientes con características clínicas y epidemiológicas compatibles con LTA fueron analizadas. El diagnóstico parasitológico se realizó tomando una muestra del borde de la lesión para el frotis que fue coloreado con Giemsa al 10% y examinado bajo microscopía óptica de inmersión para la búsqueda de amastigotes. El diagnóstico microscópico semicuantitativo clasificó cada frotis según la densidad de los parásitos en P1+: 1-10 parásitos/1000 campos, P2+: 1-10 parásitos/100 campos, o P3+:  $\geq 10$  parásitos/10 campos y frotis negativo: 0 parásitos/1000 campos.

**Análisis estadísticos:** Se usaron modelos lineales generalizados mixtos (MLGM) (función de enlace de Poisson) para comparar la abundancia media de flebótomos (por trampa-noche) por especie, sexo y mes de captura. Todos los análisis con valores de  $p < 0,05$  para un nivel de significación del 95% se consideraron estadísticamente significativos. Se trabajó con Infostat software (Infostat v 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina <http://www.infostat.com.ar>) para los análisis estadísticos y construcción de figuras y con QGIS 3.4 (<http://www.qgis.org/es/site/>) para el diseño de mapas.

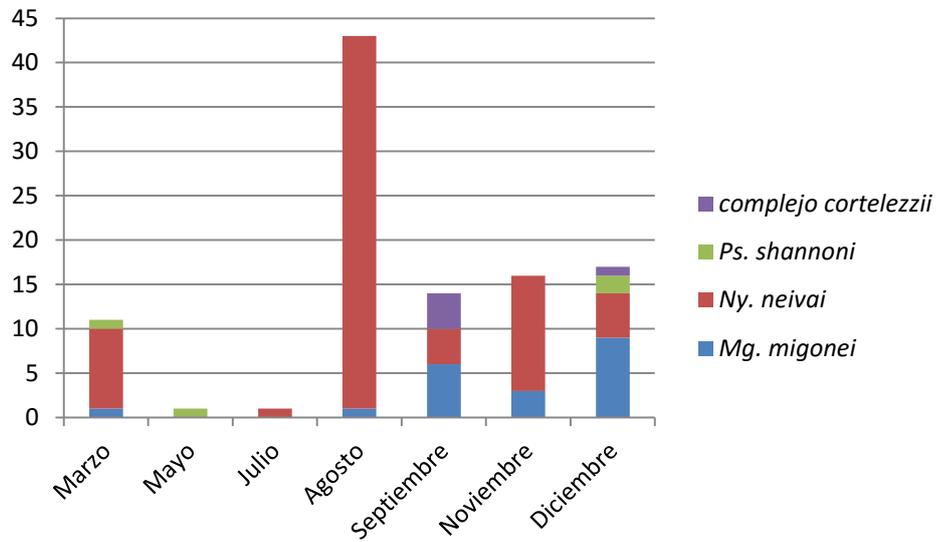
## RESULTADOS

Se capturó un total de 3.419 flebótomos, 102 hembras en el sitio 1 (El Cedral) y 3.317 flebótomos totales en el sitio 2 (N. Taranto) (1.434 hembras y 1.883 machos). En ambos sitios *Nyssomyia neivai* fue la especie de mayor abundancia ( $p < 0,05$ ); la diversidad de especies capturadas fue prácticamente idéntica, aunque *Micropygomyia* spp. sólo estuvo presente en el sitio 2 (Tabla 1).

Especie	Sitio 1	Sitio 2		Total por especie
	F	F	M	
<i>Ny. neivai</i>	73	1319	1745	3137
<i>Mg. migonei</i>	20	87	71	178
Complejo <i>cortelezzii</i> *	5	21	9	35
<i>Pa. shannoni</i>	4	0	1	5
<i>Mi. spp.</i>	0	0	1	1
<i>Pa. punctigeniculata</i>	0	1	0	1
<i>Lu. spp.</i>	0	6	56	62
<b>Total por sexo</b>	102	1434	1883	3419

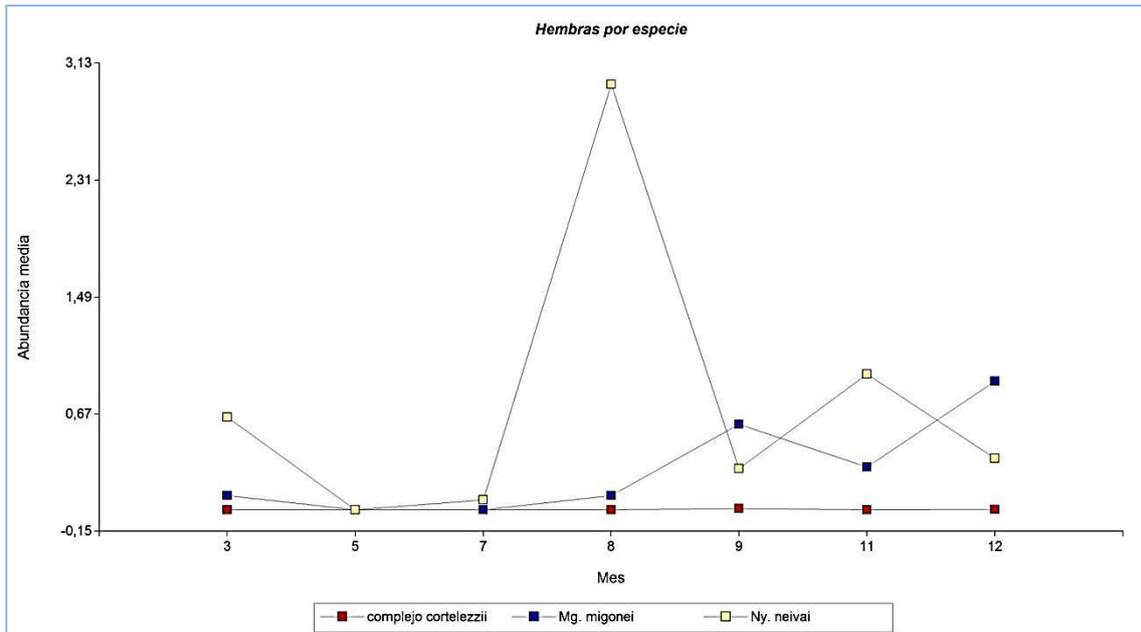
**Tabla 1:** Abundancia por sexo de especies de flebótomos capturadas en sitios periurbanos de SRNO. \*Los machos de complejo *cortelezzii* fueron identificados como *Evandromyia cortelezzii*.

En barrio el sitio 1, la especie de mayor abundancia fue *Ny. neivai*, seguida por *Migonemyia migonei*, complejo *cortelezzii* y *Psathyromyia shannoni* ( $p < 0,05$ ), entre las dos últimas especies no se observaron diferencias significativas entre sus abundancias. El mes de mayor abundancia de hembras fue agosto ( $p < 0,05$ ), seguido por diciembre y noviembre (Figura 12).

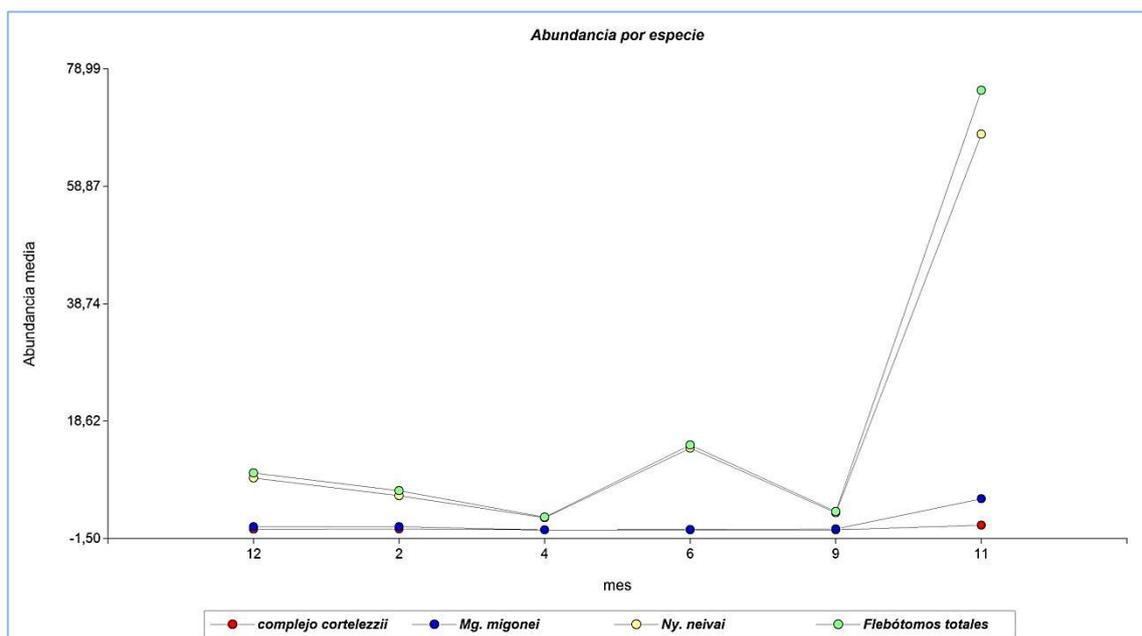


**Figura 12:** Abundancia de hembras de flebótomos capturadas en sitio 1, El Cedral.

Las hembras de *Ny. neivai* tuvieron al menos dos picos de abundancia en los meses de agosto y noviembre, mientras que las de *Mg. migonei* fueron más abundantes en los meses de diciembre y septiembre. A su vez, las hembras de complejo *cortelezzii* tuvieron una abundancia prácticamente nula en todos los meses de muestreo. No se observaron diferencias significativas entre las abundancias mensuales de las especies, posiblemente por estar representadas por un número bajo de ejemplares (Figura 13).

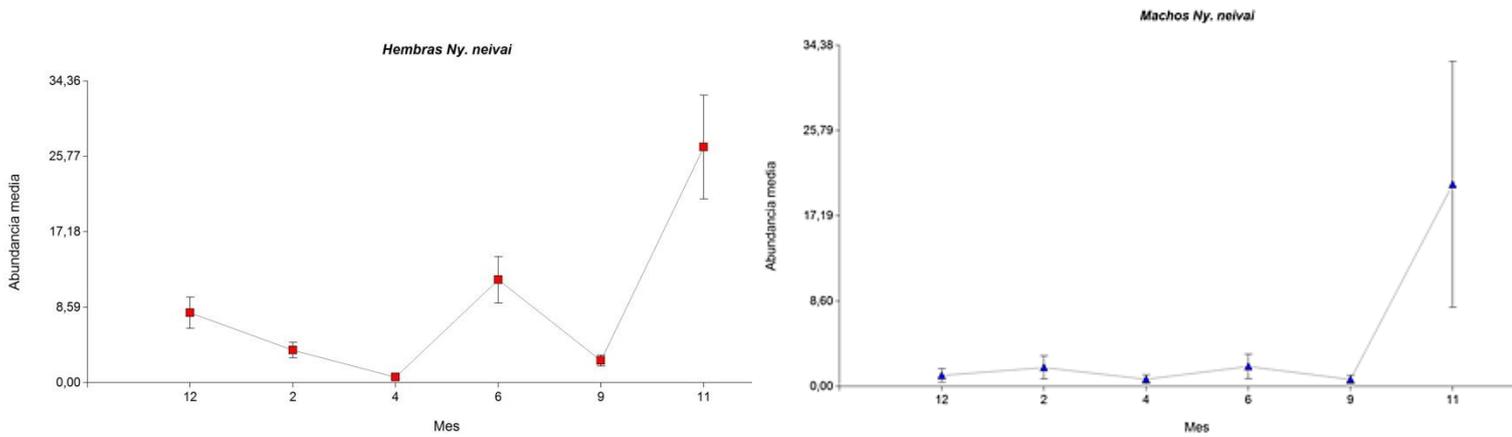


En el sitio 2, la especie de mayor prevalencia fue *Ny. neivai* representando el 92,4% del total de flebótomos capturados (Figura 14); en abundancia le siguieron las especies *Mg. migonei* y complejo *cortelezzii* ( $p < 0,05$ ), el resto de especies no se consideraron por estar escasamente representadas. Los meses de mayor abundancia fueron noviembre y junio ( $p < 0,05$ ), mientras que septiembre y abril fueron los meses de menor abundancia no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos.



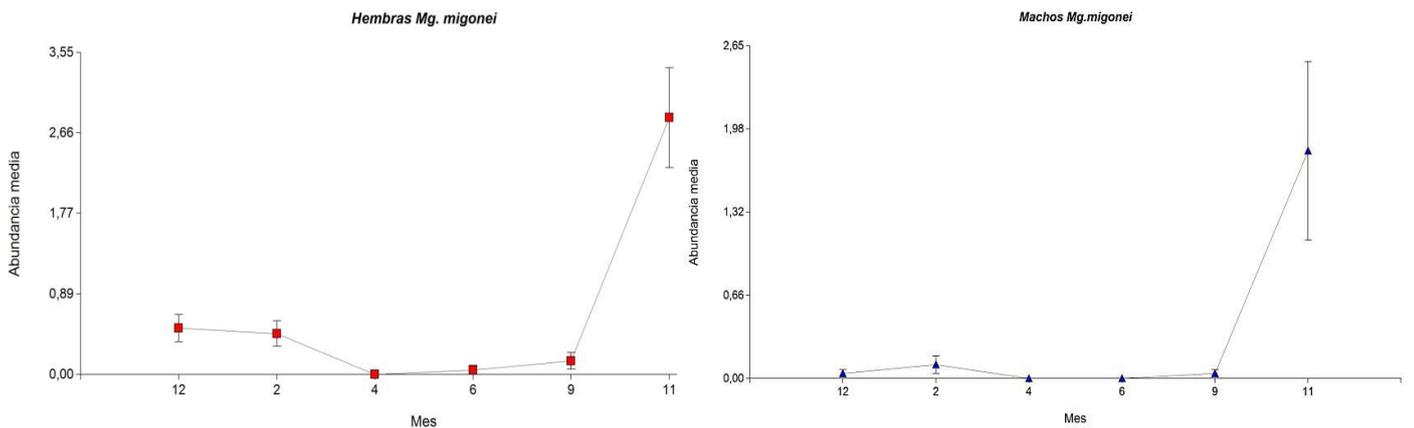
**Figura 14:** Variación de abundancia bimestral de especies de flebótomos del sitio 2.

Las hembras de *Ny. neivai* fueron más abundantes que los machos en todos los meses de muestreo y tuvieron una variación bimodal, siendo los meses de noviembre y junio los de mayor abundancia ( $p < 0,05$ ). Para los machos, el mes de mayor abundancia fue también noviembre, seguido por los meses junio y febrero, no presentando estos dos últimos diferencias significativas entre ellos (Figura 15).



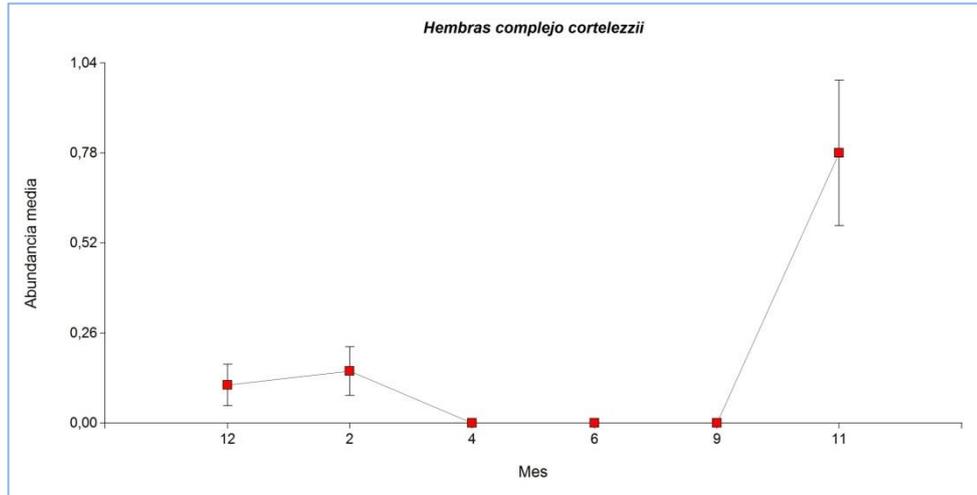
**Figura 15:** Variación de abundancia bimestral de hembras y machos de *Ny. neivai* en sitio 2.

Las hembras de *Mg. migonei* fueron más abundantes que los machos, ambos sexos tuvieron un pico de abundancia en noviembre aunque este no mostró tener diferencias significativas con las abundancias de los otros meses. Las hembras tuvieron una abundancia casi homogénea entre diciembre de 2016 y febrero de 2017, mientras que los machos estuvieron prácticamente ausentes (Figura 16).



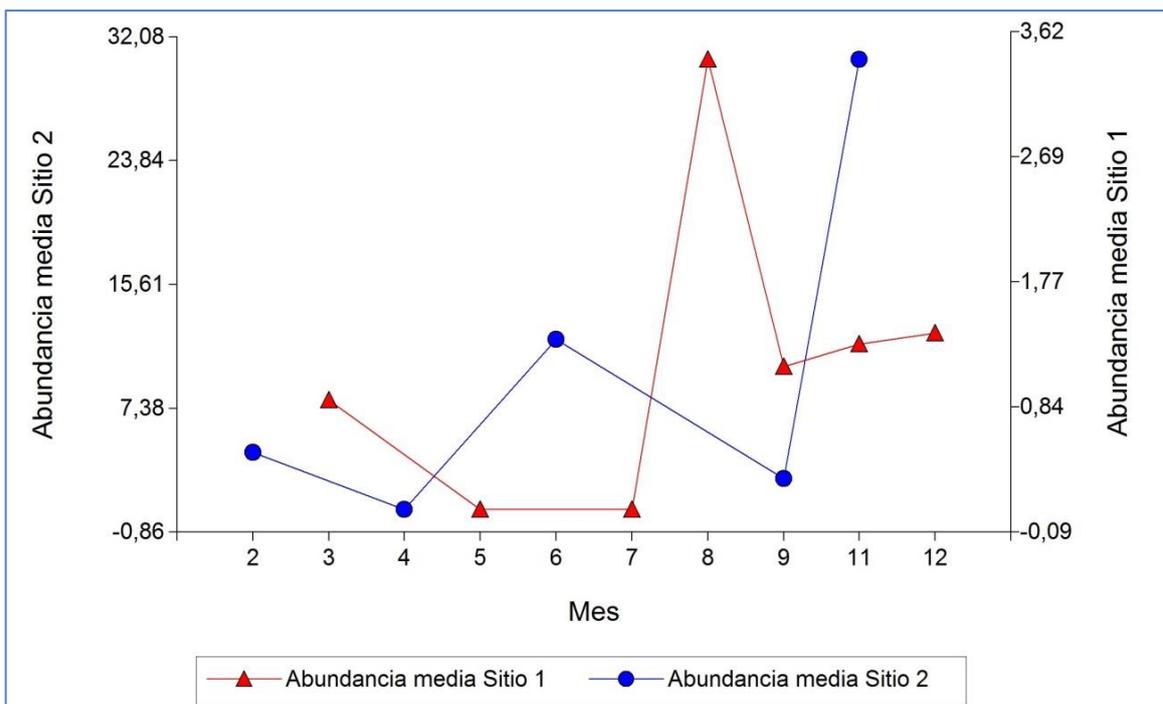
**Figura 16:** Variación de abundancia bimestral de hembras y machos de *Mg. migonei* en sitio 2.

Las hembras de complejo *cortelezzii* tuvieron un pico de abundancia en noviembre luego de estar ausentes en abril, junio y septiembre. El segundo mes de mayor abundancia fue febrero ( $p > 0,05$ ) (Figura 17).



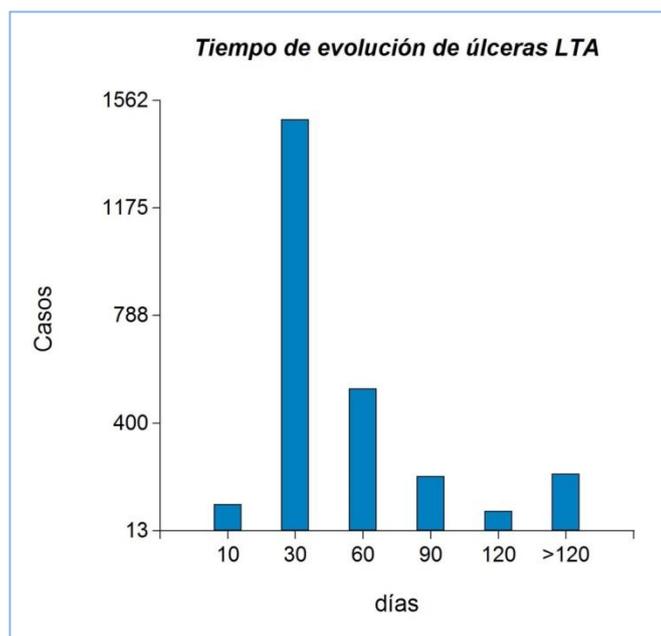
**Figura 17:** Variación de abundancia bimestral de hembras de complejo *cortelezzii* en sitio 2.

En la figura 18, se observa la abundancia media de hembras capturadas en el Sitio 1 y en el Sitio 2. Los meses de muestreo coincidentes fueron septiembre y noviembre, aunque de años diferentes.



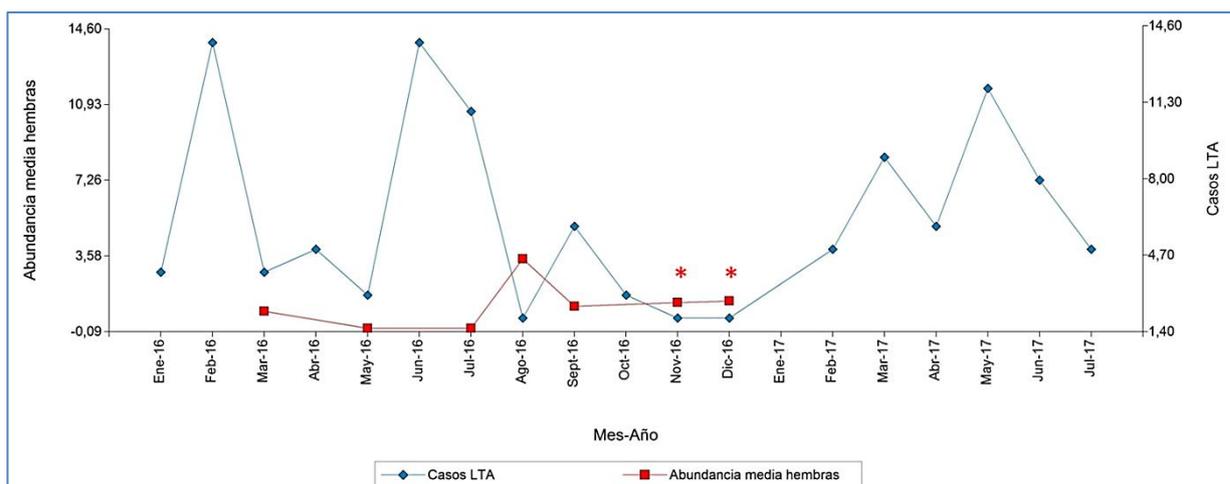
**Figura 18:** Abundancia media de hembras capturadas en Sitio 1 (El Cedral) y en Sitio 2 (Taranto).

El análisis de casos de LTA incluyó 2.630 pacientes diagnosticados en el IIET desde noviembre de 1.985 hasta noviembre de 2.018. De estos, 2.159 contaban con información sobre la localidad de residencia y el 48% (1.046/2.159) perteneció al departamento de Orán. La relación sexo masculino: femenino fue de 4:1 y respecto a la edad de los pacientes, esta tuvo una mediana de 32 años (RIQ: 20-47). Además, se determinó que el tiempo de evolución que mayoritariamente tuvieron las lesiones de los pacientes fue de 1 mes (Figura 19).



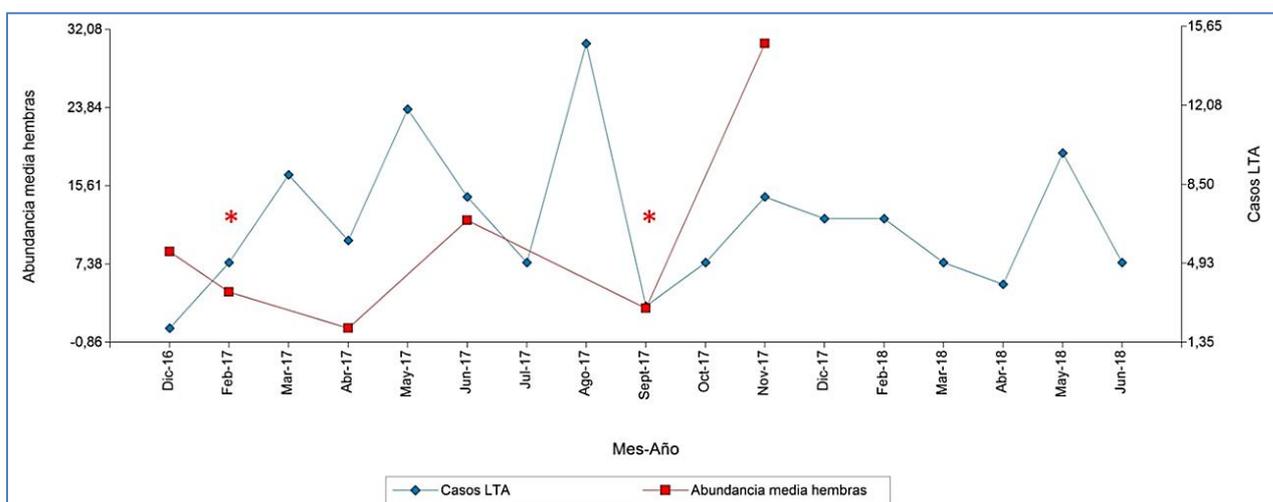
**Figura 19:** Número de casos de LTA diagnosticados según el tiempo de evolución de las lesiones.

La figura 20 representa la abundancia de las hembras capturadas en el sitio 1 y la variación mensual de los casos de LTA de pacientes con residencia en la ciudad de Orán que fueron diagnosticados en el mismo año de muestreo y algunos meses posteriores. El mes que presentó mayor abundancia de hembras fue agosto (42/102); y los meses que tuvieron una mayor cantidad de hembras grávidas fueron noviembre (10/16) y diciembre (8/17).



**Figura 20:** Variación mensual de casos de LTA de pacientes de la ciudad de Orán y abundancia media de hembras del sitio 1. \*: meses de mayor proporción de gravidez.

De igual manera, en la figura 21 se puede visualizar la abundancia de las hembras capturadas en el sitio 2 junto con la variación mensual de los casos de LTA de pacientes de la ciudad de Orán, diagnosticados en el año 2017 y parte del 2018. Los meses de mayor abundancia de hembras fueron noviembre (669/1.434) y junio (262/1.434), respectivamente. En los meses de febrero (n=145) y septiembre (n=59), el 100% de las hembras capturadas estuvo grávido.



**Figura 21:** Variación mensual de casos de LTA de pacientes de ciudad de Orán y abundancia media de hembras del sitio 2. \*: meses de mayor proporción de gravidez.

## **DISCUSIÓN**

En muestreos realizados en dos sitios periurbanos de la ciudad de Orán durante los años 2016 y 2017 se capturaron 3.419 ejemplares de flebótomos. En el sitio 1 (El Cedral) se capturaron 102 hembras, mientras que en el sitio 2 (N. Taranto) se colectaron 1.434 hembras y 1.883 machos. En ambas áreas de muestreo la especie de mayor prevalencia fue *Ny. neivai*; seguida, respectivamente, por *Mg. migonei* y complejo *cortelezzii*; lo que es consistente con estudios entomológicos previamente realizados en la zona (Salomón *et al.* 2004; Quintana *et al.* 2010).

En el sitio 2 la abundancia de *Mg. migonei*, respecto a la de *Ny. neivai*, fue prácticamente constante sin presentar picos significativos (Figura 14). En contraste, en el sitio 1 las abundancias de ambas especies tuvieron picos definidos que alternaron entre sí a lo largo de los meses de captura (Figura 13). De esta manera, se destaca la existencia de riesgo constante de transmisión en la zona, incluso en los periodos en los que la abundancia de *Ny. neivai* es baja. De hecho, estudios anteriores, reportaron la asociación de *Ny. neivai* con *Mg. migonei* en ambientes modificados por el hombre y sugirieron que siendo *Mg. migonei* una especie zoófila podría actuar como nexo entre el ciclo de transmisión zoonótica y antropozoonótica (Chaves & Añez, 2004; Salomón *et al.*, 2004a).

Analizando la variación de la abundancia de las especies de flebótomos, se determinó que las hembras capturadas en el sitio 1 tuvieron un pico de abundancia en el mes de agosto; mientras que las hembras del sitio 2 predominaron en los meses de noviembre y junio ( $p < 0,05$ ) (Figura 18). Sin embargo, aunque ambos sitios se encuentran cercanos entre sí y forman parte de una franja de vegetación continua, no resulta pertinente establecer comparaciones debido a que los meses de muestreos no fueron los mismos, a excepción de septiembre y noviembre.

De igual manera, es importante destacar que en el sitio 1 las capturas de flebótomos se desarrollaron a lo largo del 2016 y en el sitio 2, mayoritariamente, a lo largo del 2017. Al tratarse de años diferentes, las abundancias de flebótomos se tornan incomparables por estar ampliamente

asociadas a las condiciones climáticas (temperatura mínima y máxima y humedad relativa) de hasta 24 semanas antes de los muestreos, ya que estas variables influyen en la actividad metabólica de los insectos (Salomón *et al.*, 2011). Asimismo, la abundancia de *Ny. neivai* también mostró estar asociada con las precipitaciones del año previo a las capturas, por ser estas responsables del establecimiento de árboles inflamables que representan nuevos sitios de cría de flebótomos (Salomón *et al.*, 2004a, 2011).

En este mismo sentido, los muestreos llevados a cabo en el sitio 1 fueron de una noche/mes, lo que significa que los valores de abundancia también pueden estar sesgados, pudiéndose haber registrado aleatoriamente cantidades atípicas de flebótomos afectadas en gran medida por las condiciones climáticas (Salomón *et al.*, 2011). Así se pone de manifiesto que las variables climáticas modulan la abundancia de flebótomos tanto por influir biológicamente en ellos como también por ser determinantes en la composición del paisaje, repercutiendo en la disponibilidad de fuentes de alimento y de refugios de flebótomos (cañas de bamboo y bananos son preferidos por estos insectos) (Salomón *et al.*, 2011).

El análisis de la abundancia de hembras capturadas junto con la variación mensual de casos de LTA, determinó que noviembre fue uno de los meses donde hubo mayor proporción de hembras grávidas (mayor riesgo de infección) capturadas en el sitio 1, y el pico inmediato superior de pacientes tuvo lugar en el mes de marzo (Figura 20). Este desfase puede explicarse considerando que estudios de infecciones experimentales en humanos determinaron la existencia de un período de incubación variable de alrededor de dos meses (Melby, 1991), lo que sumado a los 30 días de tiempo de evolución de las lesiones (Figura 19), genera un lag de tres meses entre la infección y el pico de diagnóstico de pacientes. Esto también se manifestó con las hembras del sitio 2 (Figura 21); en febrero se capturó la mayor cantidad de hembras grávidas y el pico de pacientes diagnosticados tuvo lugar en mayo, es decir tres meses después.

En un trabajo llevado a cabo en el norte de Salta, se capturaron semanalmente flebótomos durante el periodo 1.990-1.993 y con el estudio

mensual de la población se determinó la existencia de un patrón anual bimodal, con picos de abundancia en verano-otoño y en primavera-verano. El *primero* de estos fue el de mayor proporción de hembras grávidas (Salomón *et al.*, 2011), lo que coincide con nuestros resultados del sitio 2 en el mes de febrero. También, la abundancia de las hembras fue analizada junto con la cantidad de casos diagnosticados semanalmente considerando un periodo de incubación de 15 días (Salomón *et al.*, 2011). A partir de los datos, es posible estimar que el tiempo de evolución de las lesiones fue de  $\approx 70$  días.

Resulta interesante destacar que en las infecciones experimentales en humanos, a las que se hizo referencia anteriormente, se trabajó con la especie *Leishmania (Leishmania) mexicana*, y que los tiempos de evolución de lesiones determinados en este trabajo y en el de Salomón *et al.*, 2011 son diferentes. Sin embargo, ambos análisis concuerdan en la existencia de un lag de aproximadamente 90 días entre la infección y el diagnóstico de los pacientes.

Las diferencias entre los valores de tiempo de evolución determinados en ambos estudios (30 vs. 70 días), puede atribuirse al análisis de un mayor número de casos incluidos en este trabajo y a la estandarización del cuestionario para los pacientes a lo largo de los últimos años, lo que pudo contribuir a registrar datos con mayor sistematicidad y uniformidad. De igual manera, aunque actualmente la comunidad de Orán y sus alrededores cuenta con una desinformación acerca de la enfermedad que resulta alarmante, el conocimiento sobre la leishmaniasis y el contacto con personas que la padecen y padecieron, aumentó respecto a los inicios de los años 90 lo que pudo repercutir en la decisión de acudir al médico para diagnóstico y tratamiento por parte de los pacientes.

Es importante destacar, el carácter subjetivo que tiene el trabajo con las fichas médicas de los casos ya que la anamnesis o el entrevistador pueden sesgar la información y sobre todo los pacientes pueden tener dificultades para recordar con precisión cuándo se originó la lesión o el momento en que fueron picados por un insecto diminuto que la mayoría de las veces es desconocido para ellos. También, hay que considerar que el periodo de incubación se debe, en parte, al sistema inmunológico de cada paciente y que el tiempo de

evolución de las lesiones depende del tiempo requerido para que los pacientes consideren necesario acudir al médico y además tengan acceso al sistema de salud para diagnóstico y tratamiento.

Finalmente, a partir del análisis de los pacientes residentes de Orán que fueron diagnosticados en el periodo en el cual se muestreó, y algunos meses posteriores (2016-2018), es posible asumir que la transmisión de *Leishmania* spp. se debió al patrón de ciclo y transmisión silvestre producto de actividades laborales en zonas de vegetación poco modificada, ya que la proporción de hombres: mujeres fue 6:1 y sólo el 4% (10/228) de los casos fue menor de 14 años. No obstante, estudios epidemiológicos realizados anteriormente en el mismo departamento, sugieren que también tiene lugar la transmisión domiciliar y peridomiciliar (Gil *et al.*, 2010; Sosa-Estani *et al.*, 2001). En este contexto, se resalta el valor e importancia de la abundancia y distribución de flebótomos como indicadores fundamentales para la delimitación de áreas de alto riesgo para planificar y ejecutar medidas preventivas destinadas a toda la población.

**CAPÍTULO 3: IDENTIFICACIÓN  
MOLECULAR DE FLEBÓTOMOS A  
TRAVÉS DE PCR-RFLP DEL GEN  
18S ARNr.**

## **INTRODUCCIÓN**

Las enfermedades transmitidas por vectores son causadas por patógenos que afectan desproporcionadamente a las poblaciones humanas más pobres de zonas tropicales y subtropicales (WHO, 2010). Aquellas de mayor importancia mundial son el paludismo, el dengue, la filariasis linfática, la leishmaniasis, la esquistosomiasis, la enfermedad de Chagas, la fiebre amarilla y la oncocercosis (WHO, 2014).

Las principales enfermedades transmitidas por vectores constituyen aproximadamente el 17% de las enfermedades transmisibles y causan más de 700.000 muertes al año (OMS, 2017). Más del 80% de la población mundial vive en zonas en las que hay riesgo de contraer al menos una de las principales enfermedades vectoriales, mientras que más del 50% de la población vive en zonas en las que pueden contraer dos o más de estas enfermedades (OMS, 2017). Asimismo, este tipo de enfermedades representan para los gobiernos de países endémicos gastos económicos difíciles de solventar que se deben al control de vectores y asistencia de casos. En los hogares afectados, los costos generados se relacionan con las medidas de protección individual, tratamiento médico y la consiguiente disminución de los ingresos por una menor productividad o por ausencias laborales por enfermedad (OMS, 2017; WHO, 2014).

En el mundo se han descrito 1.000 especies de flebótomos y 530 de ellas habitan en América (Shimabukuro *et al.*, 2017). En cuanto a la fauna flebotomínea de Argentina, se registraron 37 especies que se distribuyen en 14 provincias (Szelag *et al.*, 2016), las especies de mayor abundancia son: *Ny. neivai*, *Mg. migonei*, *Pa. shannoni*, *Pa. punctigeniculata*; *Ev. cortelezzii* (Salomón *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2010), *Ev. sallesi* (Barroso *et al.*, 2007), *Mi. quinquefer*, *Ny. whitmani* (Rosa *et al.*, 2012; Salomón *et al.*, 2009) y *Lu. longipalpis* (Bravo *et al.*, 2013). La nomenclatura se ajusta a lo propuesto por Galati, 2003 y Marcondes, 2007.

Por lo general, la identificación de especies de flebótomos se basa en la observación de estructuras internas como el cibario y la espermoteca de las hembras y la genitalia externa de los machos (Young and Duncan, 1994). Sin

embargo, este procedimiento demanda mucho tiempo, requiere experiencia y habilidades taxonómicas, e incluso puede resultar insuficiente para diferenciar especies morfológicamente similares (Lane and Crosskey, 1994). Además, no se puede aplicar a dos o más flebótomos de forma simultánea y es común que las estructuras de valor taxonómico de los insectos se dañen durante el proceso de limpieza o montaje (Barroso *et al.*, 2007).

Debido a las desventajas de la clasificación tradicional de flebótomos, distintos marcadores moleculares fueron estudiados con la intención de desarrollar un método más simple y preciso para identificarlos (Aransay *et al.*, 1999; Depaquit, 2014); como así también para la descripción de nuevas especies y estudios evolutivos. El análisis del gen de ARN ribosomal 18S (18S ARNr) mediante la combinación de PCR y análisis del Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) permitió la determinación exitosa de especies de flebótomos del Viejo y Nuevo Mundo (Aransay *et al.*, 1999; Barroso *et al.*, 2007; Terayama *et al.*, 2008). El gen 18S ARNr tiene como ventaja una tasa evolutiva lenta que permite el diseño de *primers* universales y el alto número de copias del gen facilita el ensayo de PCR (Aransay *et al.*, 2000). Barroso *et al.*, 2007 trabajaron con flebótomos capturados en el norte de la provincia de Salta y determinaron el patrón de restricción de *Ny. neivai*. No obstante, el estudio molecular de otros flebótomos no fue abordado por los autores aunque la presencia de al menos cinco especies más fue reportada en la zona de estudio (Salomón *et al.*, 2004a, 2008b).

De esta manera, se propone la normalización y evaluación de un método molecular capaz de identificar especies de flebótomos de manera rápida y precisa, para contribuir al diseño e implementación de acciones de control vectorial que busquen prevenir y reducir la transmisión de LTA.

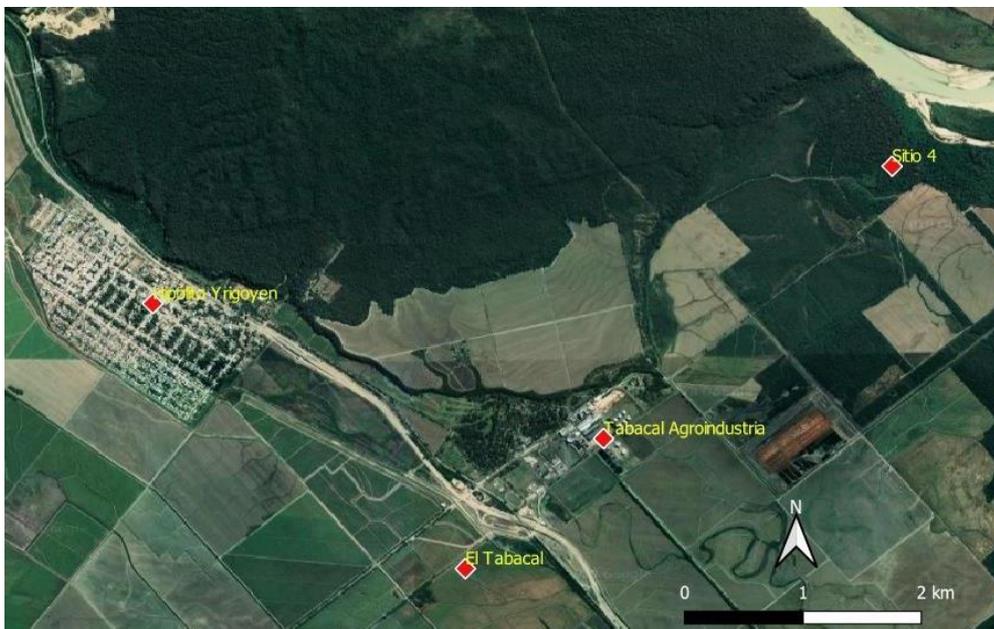
## **OBJETIVOS**

- ✓ Estandarizar la técnica PCR-RFLP del gen 18S ARNr para la tipificación de las especies de flebótomos que circulan en los sitios de muestreo.

✓ Identificar mediante PCR-RFLP las especies de flebótomos presentes en zonas endémicas de LTA.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Captura de flebótomos:** En el año 2.015 se muestreó en los sitios 3 y 4 pertenecientes al departamento de Orán. El sitio 3 ( $23^{\circ} 8'6.43''S$ ,  $64^{\circ}18'2.34''O$ ) es una zona periurbana próxima al basural municipal y las trampas se colocaron en el peridomicilio de una vivienda. El sitio 4 ( $23^{\circ}13'59.46''S$ ,  $64^{\circ}12'56.11''O$ ), corresponde a una zona rural aledaña al río Bermejo, situada en el interior de Tabacal Agroindustria (Paraje El Tabacal, Orán) (Figura 22). Se usaron 9 trampas CDC durante una noche en el sitio 3 y dos noches en el sitio 4. Para mayor detalle, ir a ANEXO I. Las trampas se colocaron a 1,5 m sobre el suelo de 19.00 a 7:00 hs y los flebótomos capturados fueron separados por sexo y conservados en etanol al 70% hasta que se procesaron.



**Figura 22:** Sitio de muestreo 4, Paraje El Tabacal, Orán.

**Identificación morfológica de flebótomos:** Las hembras capturadas en el año 2015 fueron diseccionadas con agujas estériles; la cabeza y los últimos segmentos abdominales fueron separados y colocados individualmente

en placas de 96 pocillos. El resto del cuerpo fue conservado en alcohol 70% para luego ser analizado mediante técnicas moleculares. Después, en cada pocillo se agregó lacto-fenol (ácido láctico: fenol, 1:1) para clarificar las estructuras y al cabo de 72 hs, estas fueron montadas en portaobjetos con bálsamo de Canadá para su observación en microscopio óptico compuesto. La identificación de especies se basó en la visualización de estructuras con valor taxonómico como el cibario y la espermateca, siguiendo las claves morfológicas de Young & Duncan, 1994 y Galati, 2003 y usando la nomenclatura propuesta por Marcondes en 2007.

A su vez, parte de las hembras capturadas en 2016 (60%) también fue identificada por morfología y posteriormente sometida a análisis moleculares, pero esta vez los flebotomos no fueron diseccionados previamente, es decir se trabajó con el ejemplar entero. Después de extraerse ADN a las hembras, éstas se colocaron en lacto-fenol para su clarificación e identificación. El 40% restante de hembras capturadas, fue identificado únicamente a través de PCR-RFLP para evaluar el método molecular.

**Extracción de ADN de hembras:** Inicialmente, se extrajo ADN a partir del tórax conservado (de hembras identificadas previamente por morfología). Para eliminar los restos de etanol, el material a partir del cual se hizo la extracción se colocó en papel absorbente y luego fue llevado a estufa en tubos eppendorf individuales a 42°C durante 20 minutos (Figura 23).



**Figura 23:** Previo a la extracción de ADN, las hembras conservadas en etanol 70% se colocaron en papel absorbente para eliminar el alcohol.

La extracción de ADN se realizó con 100 µl de buffer de lisis (NaCl 150 mM, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], EDTA 10 mM, SDS al 0,1%, y proteinasa K [200 µg/mL]) (Kato *et al.*, 2007), sin requerirse homogenización mecánica de las muestras. Posteriormente, para la estandarización de la extracción de ADN, se evaluaron diferentes condiciones de incubación (56°C durante 4 hs vs. 37° *overnight*) y también el material a partir del cual se hizo la extracción (ejemplar entero vs. tórax). Las condiciones fueron valoradas cualitativamente a través de los productos de PCR resultantes.

**Normalización de PCR del gen 18S ARN ribosomal (PCR 18S ARNr) para tipificación de flebótomos:** Para la amplificación de ADN de flebótomos se trabajó con los *primers* Lu.18S 1S 5' TGC CAG TAG TTA TAT GCT TG 3' y Lu.18S AR 5' CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC 3' (Barroso *et al.*, 2007), cuyo target es el gen codificante para 18S ARNr que forma parte de la subunidad ribosómica menor (40S) y por lo tanto es un componente básico de todas las células eucariotas, además representa un blanco óptimo para PCR ya que su tasa evolutiva es lenta, las regiones flanqueantes se encuentran altamente conservadas lo que permite el diseño de *primers* universales y existen numerosas copias del gen por célula (Field *et al.*, 1988; Turbeville *et al.*, 1991).

El producto de PCR es de ~1900 pb y para optimizar su amplificación, se trabajó con una concentración de ADN de 32 ng/µl, con dilución 1/5. Se probaron diferentes temperaturas de *annealing* por medio de gradientes de T° (55°C a 61°C, variando en 2°C) y se evaluaron distintas concentraciones de *primers*, en un rango de 0,25 a 1 µM, para cada especie de flebótomos capturada. Las condiciones fueron valoradas de acuerdo a la intensidad y nitidez del amplicón generado. Como control positivo de cada reacción se usó ADN de *Ny. neivai* y se usó agua Mili Q para el blanco de reacción. Después de la amplificación, los productos de PCR se sembraron en geles de agarosa al 1% para corridas electroforéticas y fueron revelados bajo luz ultravioleta después de la tinción con GelRed (Genbiotech, Argentina). Para las especies capturadas, los productos de PCR se secuenciaron y registraron en GenBank con los números de acceso MH367275, MH367276 y MH367277.

**Identificación molecular de flebótomos a través de RFLP:** Luego de verificar la amplificación mediante PCR 18S ARNr, los amplicones fueron digeridos con la enzima de restricción CviQI (que corta en los mismos sitios que Afal). En algunas muestras también se utilizó la enzima Ddel; esta fue elegida por análisis *in silico* realizados con la versión on line de NEBCutter 2.0 ([nc2.neb.com/NEBcutter2/](http://nc2.neb.com/NEBcutter2/)) para diferenciar dos especies de flebótomos que con la enzima CviQI mostraron un patrón de bandas similar. Como en algunas muestras las bandas de amplificación eran demasiado tenues, los productos de PCR debieron ser previamente precipitados con glucógeno (Sigma-Aldrich, Argentina) para que los patrones de restricción generados sean claramente visibles.

El ADN de las hembras, que anteriormente habían sido identificadas por morfología, fue analizado para así determinar los patrones de restricción de cada especie capturada. Los fragmentos digeridos se sembraron en geles de agarosa al 2% para corridas electroforéticas, se tiñeron con GelRed (Genbiotech, Argentina) y fueron visualizados bajo luz ultravioleta. La determinación de especies se basó en la comparación de los patrones de restricción generados, respecto a aquellos previamente definidos.

Las condiciones finales de la extracción de ADN, de la PCR 18S ARNr y de tipificación por RFLP, junto con los proveedores de los reactivos se detallan en la Tabla 2.

Proceso	Condiciones		Referencia
Extracción de ADN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A partir de hembras enteras.</li> <li>• Volumen Final: 100 µl buffer de lisis.</li> </ul> Incubación: 56°C, 4 hs		Kato <i>et al.</i> , 2007
PCR 18S ARNr	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Primers:</u></li> </ul> <b>Lu.18S 1S:</b> 5' TGC CAG TAG TTA TAT GCT TG 3' <b>Lu.18S AR:</b> 5' CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC 3'		Barroso <i>et al.</i> , 2007
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Condiciones de Ciclado:</u></li> </ul> <b>Desnat. Inicial:</b> 94°C, 3' 35 ciclos: *Desnat.: 94°C, 45" *Annealing: 57,5° C, 1' *Extensión: 72°C, 2' <b>Extensión final:</b> 72°C, 5'	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Concentraciones Finales:</u></li> </ul> <b>Volumen final de reacción:</b> 20 µl Templado: 2 µl  Buffer de PCR: 1x <sup>1</sup> Cl <sub>2</sub> Mg: 1,5 mM <sup>1</sup> dNTPs: 0,2 mM <sup>2</sup> Primers: 0,8 µM <sup>3</sup> Taq Polimerasa: 1,25 U <sup>1</sup>	
RFLP	<b>Enzima CviQI<sup>4</sup></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Concentraciones Finales:</u></li> </ul> <b>Volumen final de reacción:</b> 22 µl Amplicones: 10 µl  Buffer 10X: 1x <sup>4</sup> BSA (1/10): 1,5 mM <sup>4</sup> Enzima CviQI: 1 U <sup>4</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Digestión:</u> 25°C, 3 hs</li> </ul>	<b>Enzima Ddel<sup>5</sup></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Concentraciones Finales:</u></li> </ul> <b>Volumen final de reacción:</b> 30 µl Amplicones: 10 µl  Buffer 10X: 1x <sup>5</sup> Enzima Ddel: 1 U <sup>5</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Digestión:</u> 37°C, 3 hs</li> <li>• <u>Inactivación:</u> 65°C, 20'</li> </ul>	Barroso <i>et al.</i> , 2007

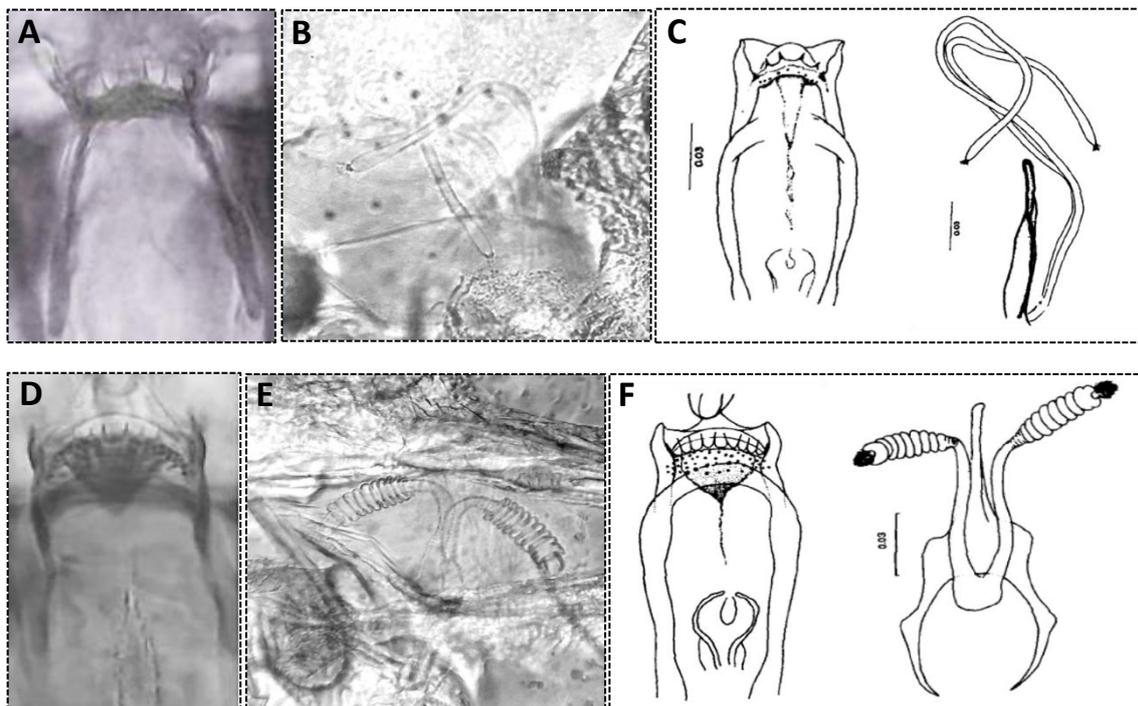
**Tabla 2:** Condiciones de extracción de ADN, PCR 18S ARNr y RFLP para la tipificación de hembras.

<sup>1</sup>: GoTaq Promega. Biotanamics, Argentina. <sup>2</sup>: Embiotec, Argentina. <sup>3</sup>: Genbiotech, Argentina. <sup>4</sup>: Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Argentina. <sup>5</sup>: New England Biolabs, Migliore Laclustra S.R.L, Argentina.

## RESULTADOS

En los sitios 1, 3 y 4 se capturaron 164 flebótomos hembras, de las cuales 122 fueron identificadas tanto morfológica (Figura 24) como molecularmente para así determinar el patrón de restricción de cada especie capturada. Una vez identificados los patrones de los fragmentos de RFLP obtenidos para las especies encontradas en los sitios muestreados, se identificaron los 42 flebótomos restantes mediante la técnica PCR-RFLP 18S ARNr previamente normalizada.

Por morfología se identificó a *Ny. neivai*, la especie más abundante en los tres sitios muestreados, seguida por *Mg. migonei* y complejo *cortelezzii*. La especie *Pa. shannoni* sólo estuvo presente en el sitio 1. Con los valores de abundancia expresados como esfuerzo de captura (n° de hembras por noche de captura, 9 trampas), el sitio donde se capturó la mayor cantidad de hembras fue el número 3 (Tabla 3).



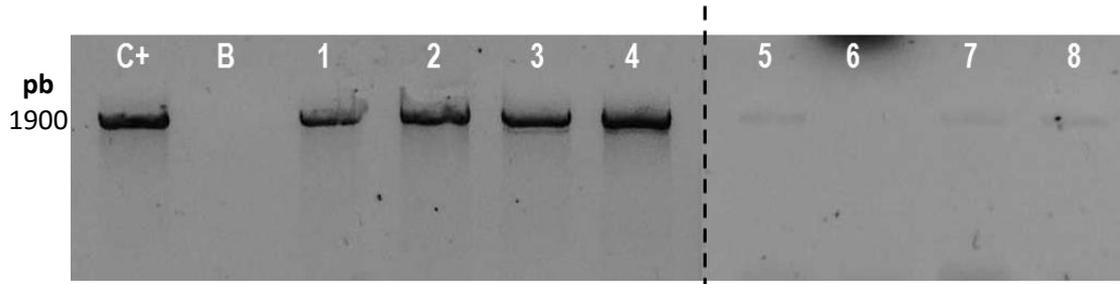
**Figura 24:** Identificación morfológica de hembras capturadas. *Mg. migonei*: **A** y **B**: Fotografías de cibario y espermateca. 400X. **C**: Esquema de estructuras taxonómicas Young & Duncan, 1994 (Fig. 58). *Ny. neivai*: **D** y **E**: Fotografías de cibario y espermateca. 400X. **F**: Esquema de estructuras taxonómicas de Young & Duncan, 1994 (Fig. 193).

		2015		2016	
Especie	Sitio	Sitio 3	Sitio 4	Sitio 1	Total por especie
	<i>Ny. neivai</i>		22	14	
<i>Mg. migonei</i>		1	2	2,9	5,9
Complejo <i>cortelezzii</i>		1	3	0,7	4,7
<i>Pa. shannoni</i>		0	0	0,6	0,6
<b>Total por sitio</b>		24	19	14,6	

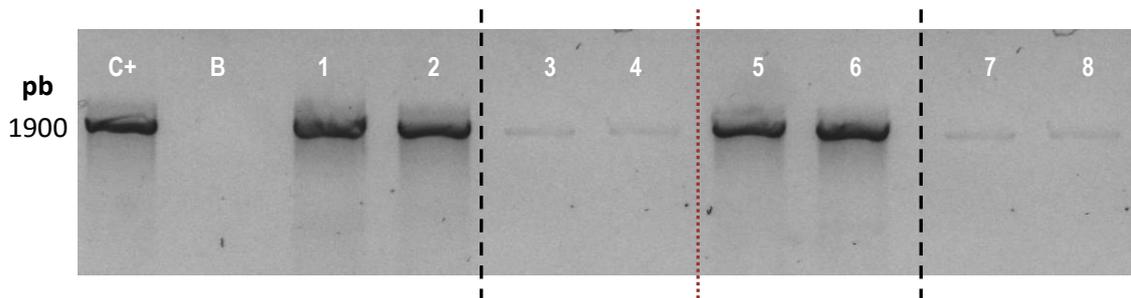
**Tabla 3:** Abundancia de hembras capturadas por sitio y noches de muestreo con 9 trampas CDC.

En muestreos hechos en el sitio 2 (N. Taranto, resultados no discutidos en este capítulo), se capturaron machos de *Evandromyia cortelezzii* junto con hembras del complejo *cortelezzii*. Se podría inferir entonces que el patrón de restricción que se reporta aquí para complejo *cortelezzii*, corresponde a hembras de *Ev. cortelezzii*; sin embargo, se considera necesaria la determinación y comparación de patrones de fragmentos de restricción de machos de *Ev. cortelezzii* y *Ev. sallesi* para arribar a conclusiones válidas.

Respecto a la estandarización de la PCR 18S ARNr, pudo determinarse que la extracción de ADN a partir de mosquitos hembras enteras permite una mejor amplificación de aquella a partir del tórax y algunos segmentos abdominales de hembras diseccionadas previamente (Figura 25). También, se pudo comprobar que las extracciones de ADN con incubación a 37°C-*overnight* y con incubación a 56°C-4 hs, no presentaron diferencias cualitativamente notorias en la intensidad de los amplicones producidos. Así, la combinación óptima para la extracción de ADN fue procesar hembras enteras con incubación a 56°C durante 4 hs (Figura 26).

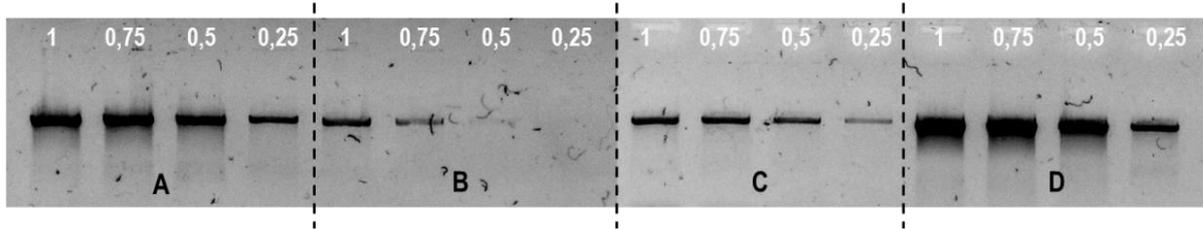


**Figura 25:** PCR 18S ARNr a partir de flebótomos. C+: ADN de *Ny. neivai*. B: Blanco de reacción. 1-4: Hembras enteras. 5-8: Tórax y parte de abdomen de hembras.

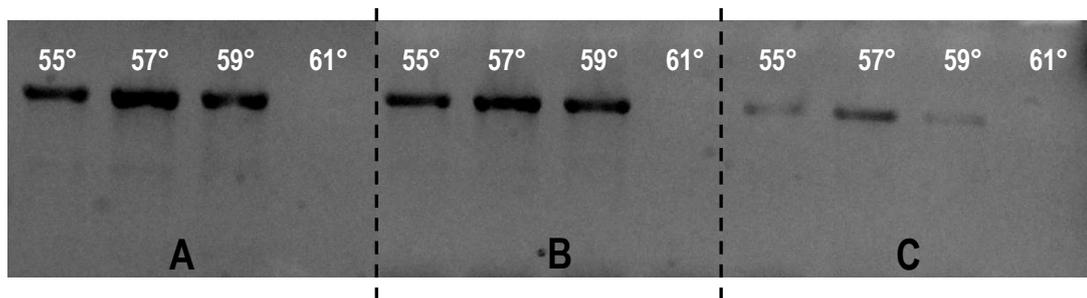


**Figura 26:** PCR 18S ARNr a partir de flebótomos. C+: ADN de *Ny. neivai*. B: Blanco de reacción. 1-2: Hembras enteras, incubación 56°C-4 hs. 3-4: Tórax de hembras, incubación 56°C-4 hs. 5-6: Hembras enteras, incubación 37°C-*overnight*. 7-8: Tórax de hembras, incubación 37°C-*overnight*.

Para la normalización de la PCR 18S ARNr también se evaluó la concentración de *primers* según las especies capturadas, pudiéndose establecer que 0,8 mM permitía una mejor amplificación, observándose una dependencia directamente proporcional entre la intensidad de los amplicones y la concentración creciente de *primers* (Figura 27). Además, a través de un gradiente de T°, se determinó que 57°C era la temperatura de *annealing* óptima (Figura 28).



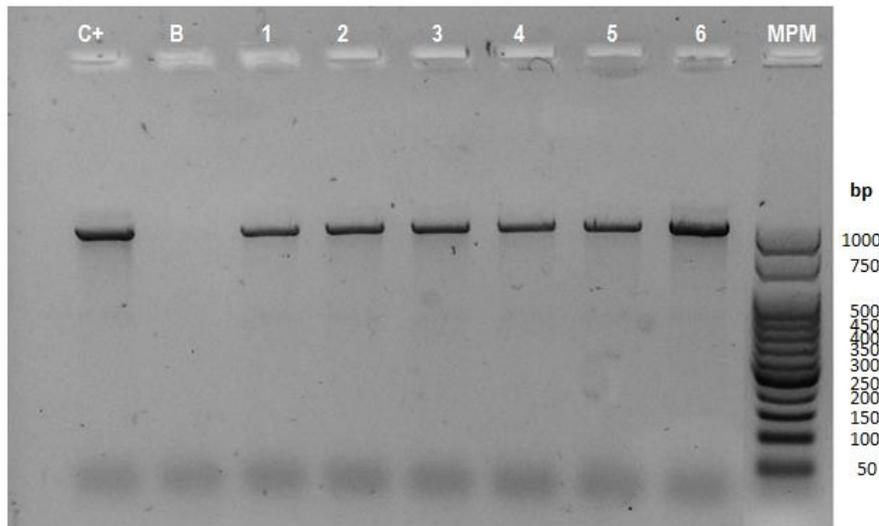
**Figura 27:** PCR 18S ARNr con concentración decreciente de *primers* 1-0,25 mM para especies de flebótomos. **A:** complejo *cortelezzii*. **B:** *Mg. migonei*. **C:** *Ps. shannoni*. **D:** *Ny. neivai*.



**Figura 28:** PCR 18S ARNr con gradiente de T° 57-61 °C para especies de flebótomos. **A:** *Ny. neivai*. **B:** *Mg. migonei*. **C:** complejo *cortelezzii*.

De esta manera, se definieron las condiciones de extracción de ADN de flebótomos y de la PCR 18S ARNr óptimas para la amplificación (Figura 29) con las que se procesaron todas las muestras restantes (Tabla 2).

Todas las PCR (164 hembras) fueron positivas, presentando los amplicones el mismo tamaño (~1900 pb) y no detectándose amplificación en los blancos de reacción (Figura 29). Las hembras cuyas extracciones de ADN fueron a partir de toráx, generaron productos de amplificación tenues que requirieron ser precipitados con glucógeno.



**Figura 29:** PCR 18S ARNr. **C+:** *Ny. neivai*. **B:** blanco de reacción. **1-6:** hembras elegidas aleatoriamente. **MPM:** marcador de peso molecular 50 pb.

Los patrones de bandas obtenidos luego de la digestión del gen 18sARNr con la enzima CviQI permitieron diferenciar *Mg. migonei* del complejo *cortelezzii* pero *Ny. neivai* y *Pa. shannoni* generaron un patrón de restricción idéntico (Figura 30). Sin embargo, mediante la digestión con la enzima Ddel se pudo identificar a *Ny. neivai*, el ensayo de RFLP mostró los perfiles que habían sido predichos por análisis *in silico* (datos no mostrados). En los patrones de restricción obtenidos, la suma de los fragmentos de ADN fue igual al tamaño de los productos de PCR no digeridos (Tabla 4).

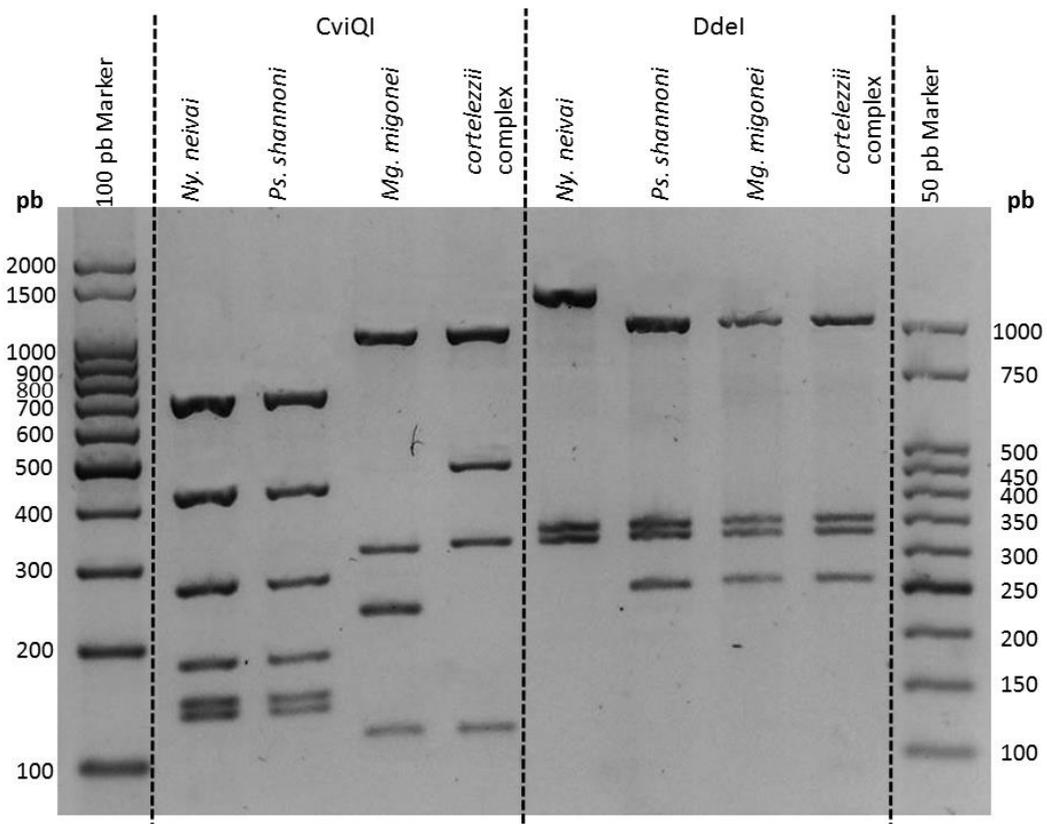


Figura 30: Patrones de restricción de las especies de flebótomos capturadas. Digestiones con las enzimas CviQI y Ddel.

Especies de flebótomos	Enzimas de Restricción			
	CviQI		Ddel	
	Número de cortes	Fragmentos de restricción (pb)	Número de cortes	Fragmentos de restricción (pb)
<i>Ny. neivai</i>	5	135, 142, 192, 285, 442, 716	2	297, 321, 1253
<i>Mg. migonei</i>	5	109, 113, 237, 240, 334, 1006	3	253, 296, 319, 1005
Complejo <i>cortelezzii</i>	3	109, 328, 477, 1005	3	252, 296, 319, 999
<i>Pa. shannoni</i>	5	110, 142, 192, 285, 442, 717	3	249, 297, 321, 1005

Tabla 4: Número de sitios de corte para cada enzima de restricción y tamaño de los fragmentos de restricción generados para las especies analizadas. En color se indican los fragmentos que permiten diferenciar los patrones de cada especie entre sí.

Respecto a los resultados de RFLP, el 100% de los ejemplares que se procesaron con PCR-RFLP pudieron ser identificados exitosamente. El 74% de hembras (122/164) fueron analizadas tanto morfológica como molecularmente, y de éstas el 11% (13/122) no pudo ser identificado por morfología, debido a un montaje inadecuado, pero sí a través de PCR-RFLP, siendo *Mg. migonei* la especie con mayor dificultad para ser identificada por morfología (Tabla 5). Para las hembras que sí fueron identificadas por ambos métodos, hubo coincidencia total en la determinación de especies.

En las hembras del sitio 1 analizadas sólo molecularmente, se encontraron 4 especies, *Ny. neivai* representó el 71,4% (30/42), *Mg. migonei* el 21,4% (9/42), complejo *cortezzezii* el 4,8% (2/42) y finalmente *Pa. shannoni* el 2,4% (1/42).

		Número de hembras		
Identificación Especie	Morfología (M)	RFLP	Proporción de hembras No identificadas mediante Morfología 1-(M/RFLP)	
	<i>Ny. neivai</i>	88	93	0,05
<i>Mg. migonei</i>	10	16	0,38	
<i>Complejo cortezzezii</i>	8	10	0,2	
<i>Pa. shannoni</i>	3	3	0	
<b>Total de hembras identificadas</b>	109	122		

**Tabla 5:** Cantidad de hembras identificadas por morfología y por RFLP. Cálculo de proporción de hembras no identificadas por M para cada especie.

Finalmente, como se mencionó en la metodología del capítulo 2, el 60% (860/1.434) de las hembras capturadas en el sitio 2 fueron analizadas por PCR-RFLP llegando exitosamente hasta el nivel de especie. Los resultados no se incluyeron en este capítulo porque son abordados en el 2° y 4° capítulo.

## **DISCUSIÓN**

La leishmaniasis, después de la malaria, es la segunda enfermedad transmitida por vectores que afecta el mayor número de personas, con una incidencia anual de 1,5 millones de casos de las formas cutáneas y 350 millones de personas en riesgo (WHO, 2010; Bruschi & Gradoni, 2018). En otros países se demostró que las acciones orientadas al control de vectores constituyen un enfoque preventivo eficaz, pudiendo reducir e incluso detener la transmisión de enfermedades vectoriales (Le Prince & Orenstein, 1916; Watson, 1921; Nájera, González-Silva & Alonso, 2011). Puntualmente, para la leishmaniasis, la fumigación con insecticidas dentro de las casas, durante esfuerzos por erradicar la malaria en la década de 1950, mostró tener buenos resultados al menos para flebótomos peridomésticos (Nadim & Amini, 1970; Seyed-Rashti & Nadim, 1975).

La diversidad de los flebótomos capturados en el sitio 1 durante el año 2016, fue concordante con la reportada a partir de estudios entomológicos previamente ejecutados en el área de estudio (Salomón *et al.*, 2008b). Asimismo, el predominio de *Ny. neivai* también coincidió con reportes anteriores (Quintana *et al.*, 2010; Krolewiecki *et al.*, 2013). En Argentina, el complejo *cortelezzii* fue encontrado infectado con *L. (V.) braziliensis* (Rosa *et al.*, 2012) y además, *Ny. neivai* es su principal vector sospechado. Esta especie de parásito es la de mayor prevalencia en el área de estudio, siendo responsable de las formas clínicas cutáneas y mucocutáneas diagnosticadas típicamente en la zona (Locatelli *et al.*, 2014; Marco *et al.*, 2005; Sosa-Estani *et al.*, 1998). Considerando que se reportó la presencia de *L. (L.) infantum* en casos humanos y caninos en la provincia de Salta (Barroso *et al.* 2015a, b) y que *Mg. migonei* es vector putativo de esta especie (Moya *et al.*, 2015), se destaca el riesgo de transmisión existente (Moya *et al.*, 2015; Salomón *et al.*, 2010).

La identificación molecular de flebótomos por PCR-RFLP coincidió en un 100% con la identificación morfológica. Es decir, para todas las hembras la determinación por morfología fue consistente y concordante con la tipificación molecular a través del análisis de los patrones de restricción generados. El 11% (13/122) de los ejemplares no pudieron ser determinados morfológicamente debido a la pérdida de estructuras taxonómicas relevantes o por un montaje inapropiado, pero sí pudieron ser identificados hasta el nivel de especie por PCR-RFLP.

Se observó que *Ny. neivai* y *Pa. shannoni* fueron indistinguibles para la enzima CviQI (Figura 30), lo cual concuerda con la clasificación propuesta por Galati, 2003 donde ambas especies, aunque son de géneros diferentes, pertenecen a la Subdivisión Psychodopygina. Además, se observó baja variabilidad entre *Mg. migonei* y el complejo *cortelezzii*, ya que las hembras no pudieron ser diferenciadas por la enzima Ddel (Figura 30); esto concuerda de nuevo con Galati, 2003, donde ambas especies pertenecen a la Subtribu Lutzomyiina; e incluso también coincide con la clasificación de Young & Duncan, 1994, donde ambas especies forman parte del grupo *Migonei*. En consecuencia, de acuerdo con Beati *et al.*, 2004, es necesario destacar el valor del aporte de los estudios moleculares para evaluar y mejorar las clasificaciones sistemáticas tradicionales de flebótomos.

Respecto a la metodología molecular utilizada en este trabajo, el haber sido capaz de identificar especies de flebótomos con no más de dos enzimas y mediante digestiones simples le otorga una gran ventaja ya que normalmente las digestiones dobles generan numerosos y pequeños fragmentos que producen patrones de restricción difíciles de leer e interpretar (Aransay *et al.*, 1999). Por otro lado, la extracción de ADN no requirió el uso de kits comerciales y pudo practicarse en flebótomos fijados con etanol, lo que implica que no se necesitan condiciones de preservación especiales. En cambio, estudios isoenzimáticos (Remy-Kristensen *et al.*, 1996) o análisis de hidrocarburos cuticulares (Kamhawi *et al.*, 1987) llevados a cabo con objetivos similares al de este trabajo, requieren tanto condiciones de almacenamiento especiales, como así también complejas medidas de seguridad para trabajar con reactivos tóxicos.

En los resultados no se detectó variación intraespecífica, se obtuvo el mismo patrón de restricción para todos los ejemplares de cada especie analizada. Esto difiere de estudios similares (Aransay *et al.*, 1999; Terayama *et al.*, 2008) y podría explicarse por el rango de muestreo ya que fue demostrado que los estudios de variación genética intraespecífica son afectados por la escala geográfica del muestreo, debido al aislamiento reproductivo por distancia de los organismos (Bergsten *et al.*, 2012).

Históricamente, la mayoría de los trabajos moleculares de flebótomos se centraron en el análisis de la variación intraespecífica para estudios con fines evolutivos y sistemáticos (Depaquit, 2014). Sin embargo, el desarrollo de relevamientos periódicos de especies de flebótomos (variación interespecífica), que permitan actualizar los registros entomológicos en áreas endémicas son fundamentales para diseñar medidas de prevención y control, más aun existiendo antecedentes acerca de la intervención accidental del hombre en el transporte y establecimiento de vectores exóticos en ciertas áreas (Becker *et al.*, 2011).

Resulta evidente que se requiere de una combinación de las identificaciones moleculares y morfológicas para alcanzar una clasificación taxonómica de flebótomos más precisa. La identificación morfológica tradicional no puede ni debe ser reemplazada por la molecular, ya que en algunos casos los análisis de PCR-RFLP pueden ser incapaces de distinguir especies incluso usando 8 enzimas de restricción diferentes (Al-Dakhil *et al.*, 2016). No obstante, los métodos moleculares tienen ventajas indiscutibles frente a los métodos tradicionales de identificación de vectores (Depaquit, 2014): En *primer* lugar, los flebótomos son artrópodos diminutos que requieren una preparación meticulosa y laboriosa antes de la identificación morfológica. En la mayoría de los casos, la clasificación de flebótomos se dificulta, e incluso se imposibilita, por la ruptura de estructuras corporales y por un montaje inadecuado, situación que no afecta la identificación molecular. En segundo lugar, la mayoría de las claves taxonómicas permiten identificar especies de flebótomos solo durante la etapa adulta (Young & Duncan, 1994), mientras que algunos estudios moleculares pueden realizarse también a partir de larvas (Vivero *et al.*, 2017). En tercer lugar, hay especies que son morfológicamente idénticas pero que

están aisladas reproductivamente; la taxonomía morfológica tradicional es incapaz de distinguir dichas especies. En cambio, las especies crípticas pueden ser identificadas exitosamente mediante análisis moleculares (Scarpassa & Alencar, 2012).

Las leishmaniasis en los últimos 20 años se propagaron considerablemente debido a factores antrópicos, principalmente la deforestación, la urbanización no planeada y los movimientos poblacionales (Ashford, 2007; WHO, 2014). De hecho, estudios de predicción de distribución de especies de flebotomos basados en datos de las provincias de Salta y Jujuy, determinaron que el impacto de las actividades humanas va a incrementar la abundancia y rango de distribución de vectores como *Ny. neivai* en la zona (Quintana *et al.*, 2012). Esto destaca la importancia y la necesidad de desarrollar métodos que permitan el control sistemático de la abundancia y distribución de flebotomos ya que el establecimiento de especies vectores es dinámico e impredecible; sumado a que recientemente se demostró la relevancia que pueden tener los países endémicos fronterizos en la vulnerabilidad de las zonas argentinas con las que limitan (Copa *et al.*, 2018; Thomaz-Soccol *et al.*, 2018).

En conclusión, la técnica PCR-RFLP del gen 18S ARNr representa una alternativa simple y rápida para el análisis molecular masivo de flebotomos, que además es económicamente compatible con el presupuesto disponible en los centros médicos y de investigación de áreas altamente endémicas. Comparando los métodos tradicionales de tipificación molecular, un análisis de restricción tiene el costo de 0,82 USD por muestrea; mientras que en la secuenciación en ambos sentidos (5'-3' y 3'-5') de productos de PCR, el monto asciende a 10 USD por muestra. Además para las restricciones, un volumen final de reacción de 20 µl es suficiente; en cambio para las secuenciaciones se requieren al menos 50 µl (según el tamaño del amplicón), lo que implica el consumo doble de reactivos de PCR.

Si bien el conjunto de técnicas moleculares PCR-RFLP podrían complementar y mejorar la identificación tradicional de flebotomos, ya que este enfoque molecular genera patrones de restricción que permiten la

determinación inequívoca de las especies estudiadas, se requieren estudios adicionales con flebótomos de áreas geográficas diferentes para confirmar la especificidad de los patrones de restricción. Finalmente, dado que el método de extracción de ADN resulta compatible con la búsqueda de ADN de patógenos (Kato *et al.*, 2007) y que como no se requiere homogenización de las muestras el riesgo de contaminación es mínimo, los protocolos estandarizados podrían ser empleados para la búsqueda de infección natural y así delimitar las zonas de mayor riesgo.

# **CAPÍTULO 4: BÚSQUEDA DE INFECCIÓN POR *LEISHMANIA* SPP. EN FLEBÓTOMOS**

## **INTRODUCCIÓN**

Las hembras de flebótomos (Diptera: Pshychodidae: Phlebotominae) actúan como vectores de parásitos de *Leishmania* spp., que son los agentes causales de las leishmaniasis (Killick-Kendrick, 1990). Sin embargo, algunas especies también se han asociado a la transmisión de otros patógenos como Phlebovirus, Orbivirus y Vesiculovirus (Depaquit *et al.*, 2010) y la bacteria *Bartonella bacilliformis* (Herrer & Christensen, 1975; Chamberlin *et al.*, 2002).

De las 530 especies de flebótomos presentes en el continente americano, sólo 56 de ellas han sido involucradas con la transmisión de *Leishmania* spp. (Maroli *et al.*, 2013; Shimabukuro *et al.*, 2017). De hecho, para que una especie de flebótomo sea considerada vector de *Leishmania* spp., debe reunir ciertas características: 1) los flebótomos deben ser antropofílicos, 2) debe haber un aislamiento de promastigotes a partir de los flebótomos identificados, 3) los parásitos aislados de los flebótomos naturalmente infectados, deben ser indistinguibles de los aislados de humanos, 4) los flebótomos infectados natural o experimentalmente tienen que permitir el crecimiento y diferenciación de los parásitos en su intestino, 5) debe existir una asociación ecológica entre flebótomos-humanos-reservorios y 6) la especie de flebótomo tiene que ser capaz de transmitir los parásitos experimentalmente (Ready, 2013).

Los puntos 2) y 4) arriba expuestos, tradicionalmente fueron abordados a través de la disección de hembras flebotomíneas para la posterior inspección microscópica de su tubo digestivo, en busca del movimiento característico de flagelados (Kamhawi, 2006; Bates, 2007). Las disecciones son necesarias para el aislamiento de parásitos y porque orientan la identificación de los mismos ya que dependiendo del subgénero de *Leishmania* al que pertenecen, los promastigotes se concentran en diferentes zonas del intestino (Lainson *et al.*, 1977) pero dado que morfológicamente no existen diferencias entre las especies, es necesario para la posterior tipificación sembrar el contenido del tubo digestivo en medio de cultivo para *Leishmania* spp.

Tratándose de insectos de 2 mm de largo las disecciones son demandantes, laboriosas, requieren amplia experiencia y resultan poco prácticas en zonas endémicas donde la abundancia de flebótomos es elevada. Es por esto, que en las últimas décadas distintos métodos moleculares fueron adaptados para la búsqueda de infección natural en flebótomos. En distintas zonas de Brasil, el uso de PCR convencional, PCR Múltiplex y la combinación de PCR con Dot Blot permitió la determinación de tasas de infección con valores variados desde 0% a 7.14%, con un valor medio de 1.68% (Carvalho *et al.*, 2008; de Pita-Pereira *et al.*, 2008, 2005; Garcia *et al.*, 2007; Jorquera *et al.*, 2005; Marcondes *et al.*, 2009; Miranda *et al.*, 2002; Oliveira-pereira *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2011; Paiva *et al.*, 2006; Saraiva *et al.*, 2009; Scodro *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Thies *et al.*, 2013); demostrando ser más sensibles que la búsqueda de infección mediante la disección del intestino de hembras (Paiva *et al.*, 2007).

En investigaciones desarrolladas previamente en Argentina con el fin de profundizar el conocimiento sobre la transmisión de leishmiasis, no se hallaron hembras positivas, es decir no se visualizaron promastigotes en el intestino de numerosas hembras diseccionadas (Rosa *et al.*, 2012; Salomón *et al.*, 2004a). No obstante, debido a la sensibilidad de la técnica molecular PCR, se determinó la presencia de *Leishmania* spp. en algunas hembras analizadas, aunque los parásitos no fueron identificados hasta el nivel de especie (Acardi *et al.*, 2010; Córdoba-Lanús *et al.*, 2006). Recientemente, en la provincia de Chaco se reportó la infección de hembras del complejo *cortelezzii* con *L. (V.) braziliensis* (Rosa *et al.*, 2012), mientras que en la provincia de Misiones, a través de PCR-secuenciación, pudo determinarse que las especies *Nyssomyia whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Lutzomyia longipalpis* y *Micropygomyia quinquefer* estaban infectadas con *L. (L.) infantum* (Moya *et al.*, 2017, 2015).

En la provincia de Salta, en el departamento de Orán se ha reportado la presencia de las siguientes especies de flebótomos: *Ny. neivai* (especie prevalente), *Mg. migonei*, complejo *cortelezzii*, *Pa. punctigeniculata*, *Pa. shannoni* y *Mi. quinquefer* (Salomón *et al.*, 2004a; Quintana *et al.*, 2010; Copa *et al.*, 2018). A su vez, *Ny. neivai* es considerado el principal vector de *L. (V.) braziliensis* (agente causal de la mayoría de los casos de LTA), tanto en el país

como en la provincia, debido a su abundancia, ecología y asociación con brotes epidémicos (Salomón *et al.*, 2004a; Quintana *et al.*, 2010; Krolewiecki *et al.*, 2013); pero hasta el momento no hay reportes de infección natural en dicha especie. En el año 2006, Córdoba-Lanús *et al.*, 2006 encontraron a través de la técnica PCR una hembra infectada (considerando la tasa mínima de infección) capturada en la localidad El Oculito, departamento de Orán, pero no se logró identificar la especie del parásito ya que la clasificación del mismo solo llegó a nivel de subgénero, *Viannia*.

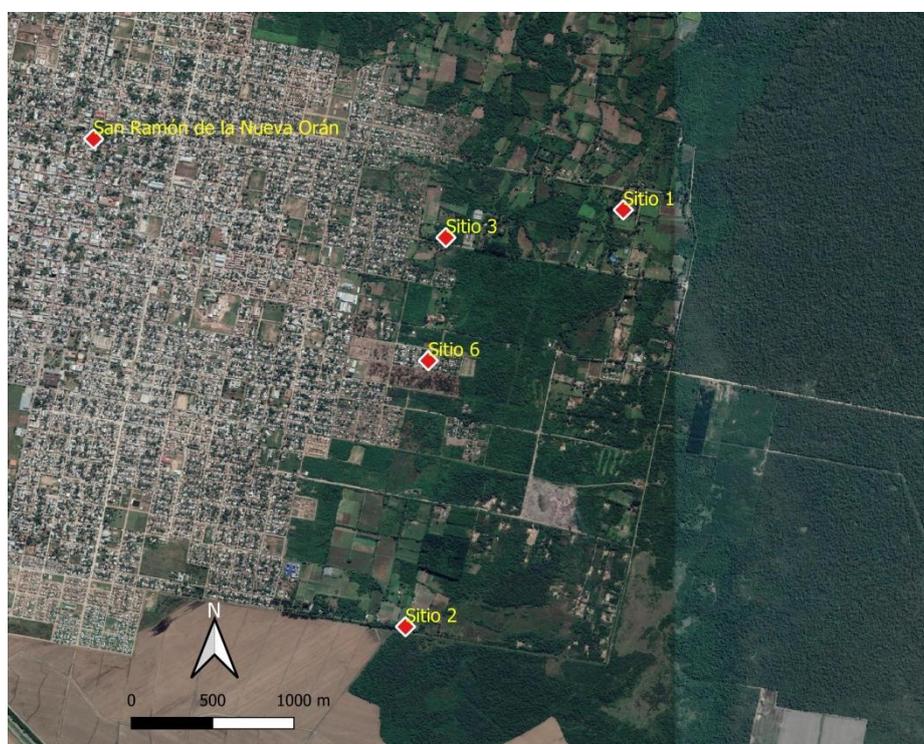
Siendo que el departamento de Orán constituye un área hiperendémica de LTA (Salomón *et al.*, 2008b) en Argentina, resulta fundamental la búsqueda de infección natural para la determinación de tasa de infección y la incriminación de vectores con la finalidad de caracterizar profundamente la transmisión de *Leishmania* spp., lo que será determinante en el diseño de medidas preventivas y estudios de vigilancia epidemiológica y entomológica.

## **OBJETIVOS**

- ✓ Buscar infección natural a través de disección de flebotomos capturados en los sitios de transmisión de *L. (V.) braziliensis*, principal agente causal de LTA.
- ✓ Detectar ADN parasitario a través de PCR genérica para *Leishmania* spp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Captura de flebótomos:** Se llevaron a cabo muestreos en diferentes sitios del departamento de Orán en los años 2015, 2016 y 2017. Con trampas Shannon, se capturaron flebótomos en los sitios 1, 2 (peridomicilio, cercano a sitios de cría de chanchos y gallinas), 3 (previamente descritos) 5 y 6. El sitio 5 ( $23^{\circ}14'34.79''S$ ,  $64^{\circ}15'54.54''O$ ), se sitúa en la zona de acceso al Cementerio de la localidad de Hipólito Yrigoyen, Orán. El sitio 6 ( $23^{\circ} 8'33.26''S$ ,  $64^{\circ}18'6.15''O$ ) es el peridomicilio de una vivienda del barrio periurbano 6 de enero, colindante a un parche de vegetación secundaria (Figura 31).



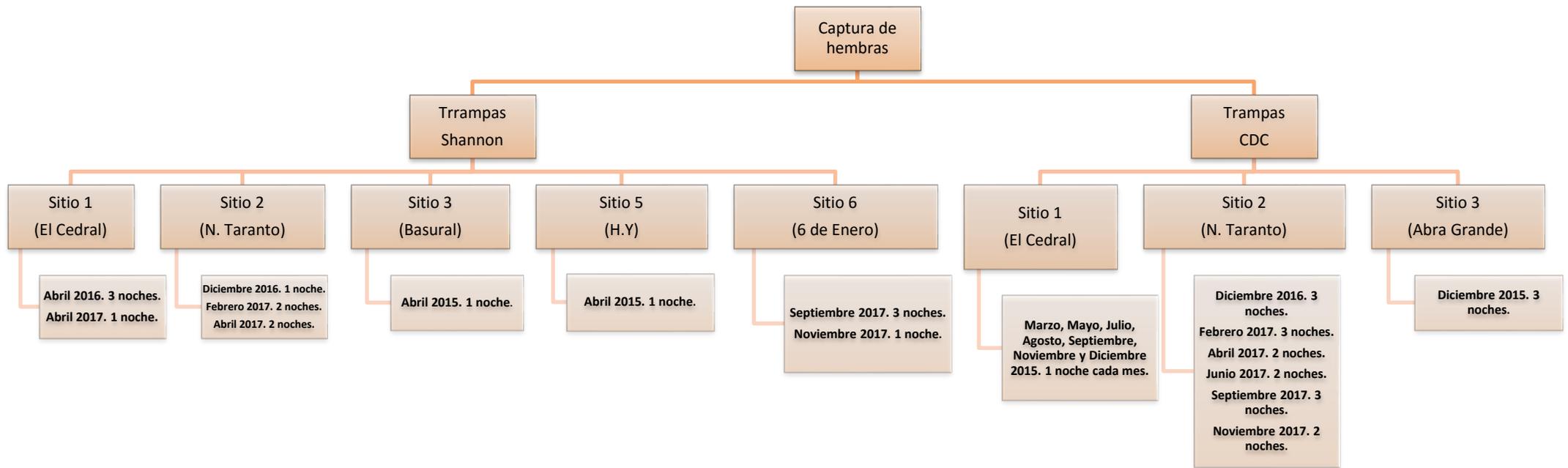
**Figura 31:** Sitios de muestreo con trampa Shannon en SRNO.

En los sitios 1, 2 (descritos previamente) y 7 se capturaron flebótomos usando trampas CDC. El sitio 7 ( $23^{\circ} 1'26.38''S$ ,  $64^{\circ}23'23.70''O$ ) es un parche de vegetación cercano a plantaciones de caña de azúcar y cítricos, situado en una zona rural de la localidad Abra Grande, Orán (Figura 32). Para mayor detalle, ir a ANEXO I. Cabe destacar, que en el sitio 7, cinco cazadores resultaron infectados con lesiones múltiples al acampar durante la noche (Krolewiecki *et al.*, 2013).



**Figura 32:** Sitio de muestreo 7, en la localidad de Abra Grande, Orán.

Para buscar infección natural en los flebótomos, las capturas se realizaron en los meses previos o durante los cuales se registraron el mayor número de casos humanos de LTA (septiembre, noviembre, diciembre, febrero, abril); a excepción de los sitios 1 y 2, en donde los muestreos se realizaron durante 1 año para estudiar también la variación de abundancia de las especies en dichas zonas (Capítulo 2). Cabe mencionar que los sitios fueron seleccionados en función de la presencia de al menos un caso positivo para LTA. Las capturas con trampa Shannon se llevaron a cabo desde las 19 hasta las 21 hs, con tres operarios por trampa; mientras que las trampas CDC fueron colocadas a 1,5 m sobre el suelo de 19 a 7 hs y los flebótomos capturados se conservaron en etanol al 70% hasta que se procesaron. El tipo de trampas usadas y la cantidad de noches de muestreo en cada sitio se detallan en la Figura 33.



**Figura 33:** Detalle de trampas y sitios de captura de hembras para la búsqueda de infección natural con *Leishmania* spp.

La trampa Shannon consiste en una carpa rectangular de tela blanca sin base que queda suspendida a 50 cm del suelo y en su interior se coloca una fuente de luz para atraer a los insectos (Figura 34).



**Figura 34:** Capturas de flebótomos con trampa Shannon.

Esta trampa suele usarse en ambientes peri o extradomiciliarios y permite la captura directa de los flebótomos ya que el operario puede identificarlos cuando se posan sobre la tela blanca de la trampa (por el tamaño y la disposición de las alas en estado de reposo) (Figura 35) y aspirarlos con los capturadores manuales (Figura 36). Se capturan ejemplares de ambos sexos pero mayoritariamente hembras, pudiendo conocerse el nivel de antropofilia de las especies capturadas.



**Figura 35:** Flebotomos posados en trampa Shannon.

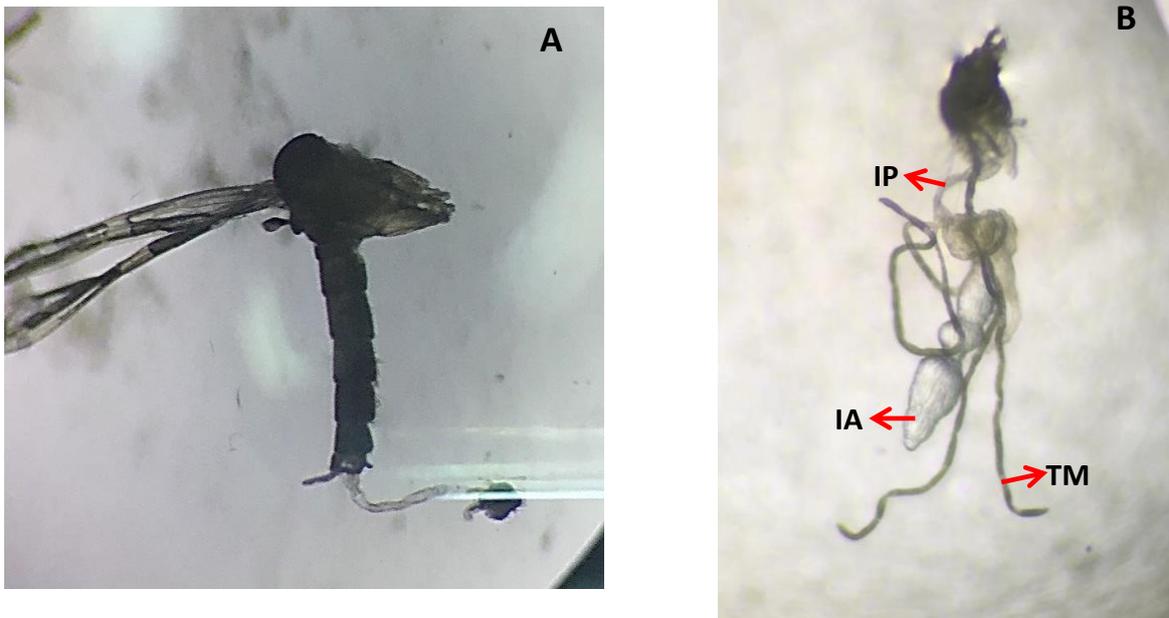


**Figura 36:** Captura de flebotomos. **A:** Operarios en trampa Shannon. **B:** Tubo capturador con flebotomos en su interior.

**Disección de hembras:** Los flebotomos fueron transportados hasta el laboratorio y sometidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante un minuto para que entraran en letargo y así poder ser colocados en un tubo Falcon con 10 mL de solución fisiológica.

Cada hembra fue colocada en una gota de solución fisiológica sobre un portaobjetos y con finas agujas de disección esterilizadas, se separó la cabeza

del tórax. Posteriormente se hizo un corte en los últimos 2 segmentos abdominales y se procedió a “tirar” de ellos en sentido contrario al resto del cuerpo de forma constante y pareja para que con ellos fuera arrastrado también el intestino de la hembra (Figura 37).



**Figura 37:** Fotografías de disección de hembras. **A:** Luego de separar la cabeza y hacer una incisión en los últimos segmentos abdominales, el intestino comienza a extraerse. 40X. **B:** Intestino completamente extraído. 40X. IA, IP: Parte anterior y posterior del intestino, respectivamente. TM: Túbulos de Malpighi.

Una vez separados, los elementos a observar fueron acomodados y posteriormente cubiertos con un cubreobjetos; luego en microscopio óptico compuesto (400X) se buscaron flagelados compatibles con la forma promastigote de *Leishmania* spp. Durante la observación microscópica, también se determinó la especie de flebótomo mediante análisis de cibario y espermateca.

En caso de visualizar formas flagelares, el intestino fue sometido a tres lavados con una solución salina que con prolina (PBSS) y penicilina (100 U/mL) estreptomomicina (50 µg/mL). Luego, con una jeringa de 5 mL cargada con 500 µl

de PBSS se aspiró el material del portaobjetos para ser sembrado en esterilidad en el medio USMARU (agar difásico más sangre de conejo desfibrinada al 20%) PBS S.

**Extracción de ADN de hembras:** De los insectos capturados con trampas CDC, las hembras fueron separadas y conservadas en alcohol 70% hasta su análisis molecular. Para la búsqueda de infección natural, previamente se comparó la extracción de ADN a partir de hembras trituradas con homogeneizadores descartables y hembras enteras, sin homogenización; como se describió en el capítulo 3 según lo propuesto por Kato *et al.*, 2007.

**Determinación de límite de detección de PCR para la búsqueda de *Leishmania* spp. (PCR ADNk):** Para la amplificación de ADN parasitario se trabajó con los *primers* 120 F: 5' GGG (G/T) AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA 3' y 120 R: 5'(G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C 3' (Degrave *et al.*, 1994), cuyo target es parte de los minicírculos del kinetoplasto. Éstos, son pequeñas moléculas de ADN circular (800 pb) que presentan una región conservada de 120 a 150 pb que representa un blanco ideal para la amplificación por PCR ya que cada parásito posee alrededor de 10.000 copias (Degrave *et al.*, 1994).

Se buscó evaluar y estimar la capacidad de la técnica para detectar distintas concentraciones de ADN de *Leishmania* spp. que representen diferentes grados de infección que los vectores capturados pudieran tener. Se trabajó con una cepa de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/AR/03/OLO1) aislada de un paciente con LTA. Dicha cepa fue tipificada previamente mediante isoenzimas y asignada al zimodema mayoritario KMS1 descrito en la provincia de Salta (Marco *et al.*, 2005).

Los parásitos se cultivaron en medio USMARU y luego en medio líquido RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% y penicilina-estreptomicina. Durante la fase exponencial, los promastigotes se cosecharon y se determinó la concentración de los mismos con una cámara de Neubauer para luego ajustar a una concentración final de  $1,27 \cdot 10^7$  parásitos/mL (p/mL).

Posteriormente, se realizaron diluciones sucesivas (1/5) hasta llegar a 1,02 p/mL.

En cada uno de los tubos con las diluciones, se agregó una hembra entera junto con los parásitos, para luego realizar la extracción de ADN. El ADN extraído fue amplificado por PCR del gen 18S ARNr de flebótomos como control de extracción y confirmación de ausencia de inhibidores de la PCR; y también por la PCR ADNk para evaluar su performance ante diferentes concentraciones parasitarias.

**Pooles de hembras:** Para la búsqueda de *Leishmania* spp. en las hembras capturadas con trampas CDC, se trabajó con pooles constituidos por ADN extraído previamente y de manera individual a 10 hembras. Para la preparación de los pooles, en tubos eppendorf de 0,6 mL se agregaron 360 µl de buffer TE (1/10) y se adicionó 4 µl de ADN extraído a hembras hasta alcanzar un volumen final de 400 µl.

**Búsqueda de *Leishmania* spp. por PCR ADNk:** Se analizaron 167 pooles (1.670 hembras) mediante PCR genérica para *Leishmania* spp., cuyo producto es una banda de 120 pb. Como control de extracción y a fines de evaluar la presencia de inhibidores de PCR se llevaron a cabo PCRs dúplex, capaces de en una única reacción amplificar un producto control y material genético de *Leishmania* spp., en caso de haber infección. Inicialmente, los *primers* de la PCR ADNk se combinaron con los de PCR 18S ARNr que permiten la tipificación de flebótomos. Debido a la presencia de numerosas bandas inespecíficas, para la búsqueda de ADN parasitario los pooles finalmente fueron analizados con *primers* de ADNk combinados con cebadores para proteína actina de mamíferos, que generan un amplicón de 289 pb (du Breuil *et al.*, 1993). La elección de la combinación ADNk-actina radicó en la similitud que tienen ambos sistemas de PCR tanto en las condiciones de amplificación como en el tamaño de los productos de reacción.

Asimismo, al carecer de controles positivos que permitieran estandarizar minuciosamente algún protocolo molecular, se optó por analizar las muestras

con la PCR dúplex ADNk-actina que actualmente se emplea para el diagnóstico molecular de LTA. Durante su normalización, el método fue ajustado con muestras positivas validadas por otras técnicas de diagnóstico (frotis y cultivo). Además, el sistema de PCR demostró tener un óptimo desempeño para la amplificación a partir de distintos tipos de muestras, como úlceras cutáneas en pacientes, sangre en perros y cultivos. Además de ser un método que permite determinar si las hembras estuvieron en contacto con sangre de mamíferos, tiene buena especificidad, sin existir cruza de reacción con *Trypanosoma cruzi*.

Como controles positivos se usaron pooles artificiales compuestos por el ADN de machos y ADN de cultivo de *L. (V.) braziliensis* y como blanco de reacción se usó agua Mili Q. Después, los productos de PCR se sembraron en geles de agarosa al 2% para corridas electroforéticas y fueron revelados bajo luz ultravioleta después de la tinción con GelRed (Genbiotech, Argentina). Las condiciones de todas las PCR y los reactivos utilizados se detallan en la Tabla 6.

PCR	Primers	Referencia	Concentraciones Finales PCR	Condiciones de Ciclado	
PCR ADNk	120 F: 5' GGG (G/T) AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA 3'	Degrave <i>et al.</i> 1994	<b>Vol. Final de Reacción:</b> 15 µl. Templado: 2 µl  Buffer de PCR: 1x <sup>1</sup> Cl <sub>2</sub> Mg: 1,5 mM <sup>1</sup> dNTPs: 0,2 mM <sup>2</sup> Primers: 0,4 µM <sup>3</sup> Taq Polimerasa: 1,25 U <sup>1</sup>	Desnat. Inicial: 94°C, 1' 35 ciclos: *Desnat. : 94°C, 20" *Annealing: 60° C, 1:30'	
	120 R: 5'(G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C 3'				
PCR DUPLEX	120 F: 5' GGG (G/T) AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA 3'	Degrave <i>et al.</i> 1994	<b>Vol. Final de Reacción:</b> 15 µl. Templado: 2 µl  Buffer de PCR: 1x <sup>1</sup> Cl <sub>2</sub> Mg: 1.5 mM <sup>1</sup> dNTPs: 0.2 mM <sup>2</sup> Primers ADNk: 0,4 µM <sup>3</sup> Primers Actina: 0,15 µM <sup>3</sup> Taq Polimerasa: 1,25 U <sup>1</sup>	Desnat. Inicial: 94°C, 1' 35 ciclos: *Desnat. : 94°C, 20" *Annealing: 60° C, 1:30'	
	120 R: 5'(G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C 3'				
	PCR Actina	XAHR 17 : 5' CGGAACCGCTCATTGCC 3'			du Breuil <i>et al.</i> 1993
	PCR Actina	XAHR 20 : 5' ACCCACA CTGTGCCCATCTA 3'			
PCR ADNk	120 F: 5' GGG (G/T) AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA 3'	Degrave <i>et al.</i> 1994	<b>Vol. Final de Reacción:</b> 15 µl. Templado: 2 µl  Buffer de PCR: 1x <sup>1</sup> Cl <sub>2</sub> Mg: 1.5 mM <sup>1</sup> dNTPs: 0.2 mM <sup>2</sup> Primers ADNk: 0,4 µM <sup>3</sup> Primers 18S ARNr: 0,6 µM <sup>3</sup> Taq Polimerasa: 1,25 U <sup>1</sup>	Desnat. Inicial: 94°C, 1' 35 ciclos: *Desnat. : 94°C, 20" *Annealing: 58° C, 1:45'	
	120 R: 5'(G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C 3'				
	PCR 18S ARNr	Lu.18S 1S: 5' TGC CAG TAG TTA TAT GCT TG 3'			Barroso <i>et al.</i> 2007
	PCR 18S ARNr	Lu.18S AR: CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC 3'			

**Tabla 6:** Condiciones de las PCR llevadas a cabo para la detección de ADN parasitario en flebótomos capturados.

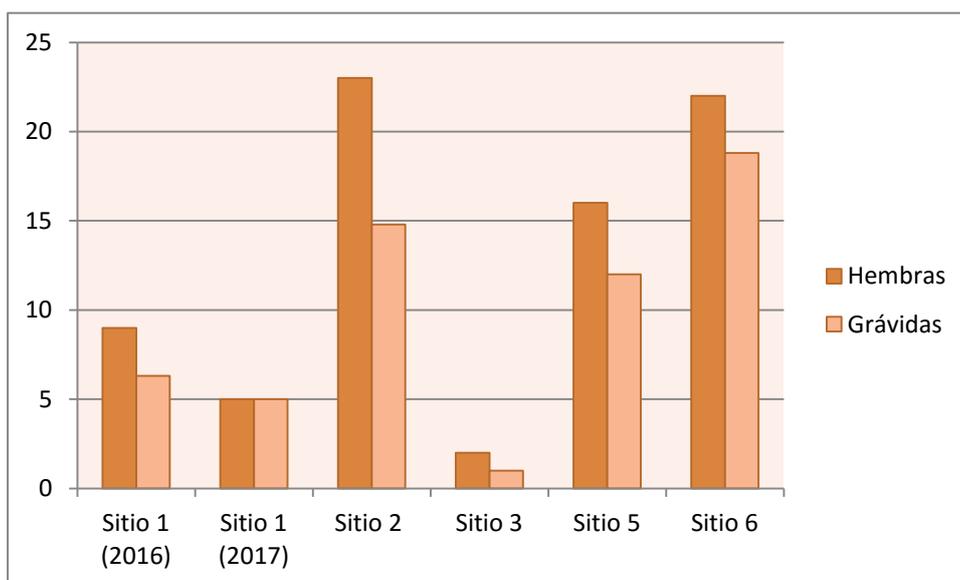
<sup>1</sup>: GoTaq Promega. Biodynamics, Argentina. <sup>2</sup>:Embiotec, Argentina. <sup>3</sup>:Genbiotech, Argentina.

## RESULTADOS

En los años 2015, 2016 y 2017, se capturaron 1.925 hembras en el departamento de Orán y en todas ellas se buscó infección natural por *Leishmania* spp. Durante los muestreos llevados a cabo en los sitios 1, 2, 3, 5 y 6, se capturaron 254 hembras con trampa Shannon y todas ellas fueron diseccionadas. De ellas, el 73% (186/254) estaba grávida (Figura 39) y el 8% (20/254) estaba alimentada (Figura 38). La observación microscópica y el cultivo de sus intestinos, fueron negativos para la infección con *Leishmania* spp.



**Figura 38:** Fotografías de intestinos de hembras. **A:** Hembra alimentada  
S: Sangre en proceso de digestión. 40X. **B:** Hembra grávida. 40X.



**Figura 39:** Abundancia y gravidez de hembras capturadas por sitio y noche de muestreo. Sitio 1: El Cedral, S2: N. Taranto, S3: Basural, S5: Acceso a Cementerio, H.Y, S6: 6 de enero.

De las hembras capturadas, *Ny. neivai* fue la de mayor abundancia, seguida por complejo *cortezzi*, *Pa. shannoni* y *Mg. migonei*; teniendo estas dos últimas abundancias similares (Tabla 7). Asimismo, expresando los resultados según el esfuerzo de captura (n° de hembras por noche de captura), en los sitios 1 y 6 se capturó la mayor cantidad de hembras y ambos sitios presentaron además abundancias similares, mientras que el sitio 3 fue el lugar con menos hembras.

	2015		2016	2017			
Sitio Especie	Sitio 3 (Basural)	Sitio 5 (Cementerio H.Y)	Sitio 1 (El Cedral)	Sitio 1 (El Cedral)	Sitio 2 (N. Taranto)	Sitio 6 (6 de enero)	Total por especie
<i>Ny. neivai</i>	1	11	5	5	19,5	20,3	61,8
<i>Mg. migonei</i>	0	1	0	0	0,4	0,3	1,7
Complejo <i>cortelezzii</i>	1	3	0,7	0	0,8	0,5	6
<i>Pa. shannoni</i>	0	0	1,7	0	0,2	0	1,9
<i>Lutzomyia spp.</i>	0	1	1,7	0	2	0,8	5,5
Total por sitio	2	16	9,1	5	22,9	22	

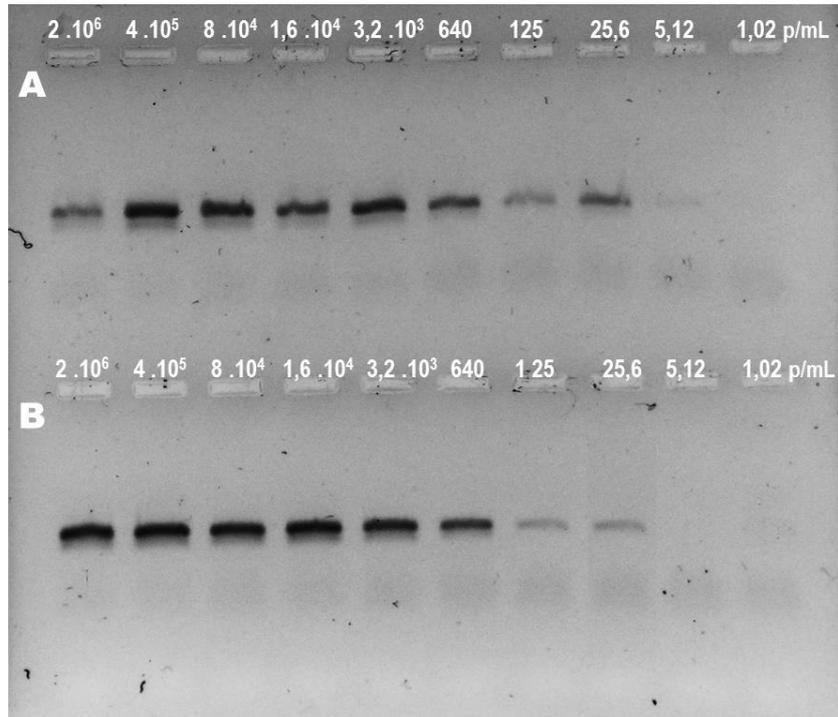
**Tabla 7:** Abundancia de hembras capturadas por sitio y noche de muestreo con trampa Shannon.

Con trampas CDC, se capturaron 1.671 hembras que fueron analizadas molecularmente para la búsqueda de parásitos, estando el 18% grávidas (309/1.671). La especie predominante fue *Ny. neivai*, seguida por *Mg. migonei* y complejo *cortelezzii*, teniendo estas últimas abundancias similares (Tabla 8). En el sitio 2 se capturó la mayor cantidad hembras, mientras que en el sitio 7 (Abra Grande), las hembras de complejo *cortelezzii* presentaron una abundancia mayor que en los sitios 1 y 2.

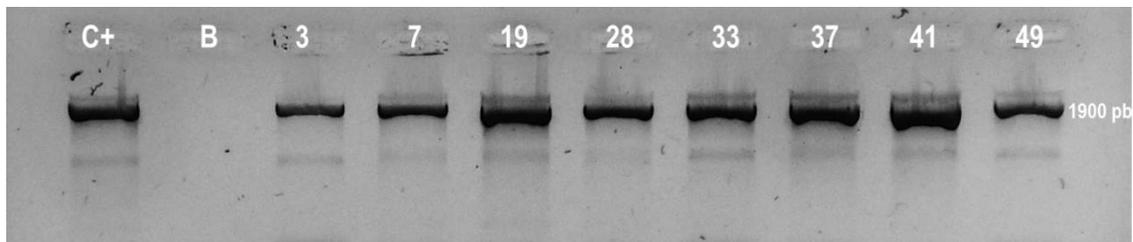
	2015	2016	2017	
Siteo \ Especie	Siteo 7 (Abra Grande)	Siteo 1 (El Cedral)	Siteo 2 (N. Taranto)	Total por especie
<i>Ny. neivai</i>	46	10,4	85,8	142,2
<i>Mg. migonei</i>	1,3	2,9	5,5	9,7
Complejo <i>cortelezzii</i>	8,3	0,7	1,3	10,3
<i>Pa. shannoni</i>	0,3	0,6	0	0,9
<i>Pa. punctigeniculata</i>	0	0	0,07	0,07
<i>Lutzomyia spp.</i>	0,7	0	0,6	1,3
<b>Total por sitio</b>	56,6	14,6	93,3	

**Tabla 8:** Abundancia de hembras capturadas por noche de muestreo con 9 trampas CDC.

Respecto a las pruebas moleculares, la determinación del límite de detección estableció que la PCR ADNk es capaz de detectar hasta 25 promastigotes presentes en una hembra (Figura 40). No se evidenciaron diferencias cualitativamente notorias entre los productos de la extracción de ADN sin homogenización y la extracción con trituración mecánica (Figura 40), es por eso que se optó por seguir trabajando con la extracción sin trituración mecánica por cuestiones prácticas y principalmente para reducir la probabilidad de contaminación entre las muestras. Las extracciones de ADN a partir de hembras enteras, se controlaron aleatoriamente mediante PCR 18S ARNr (Figura 41), resultando en todos los casos positivas.

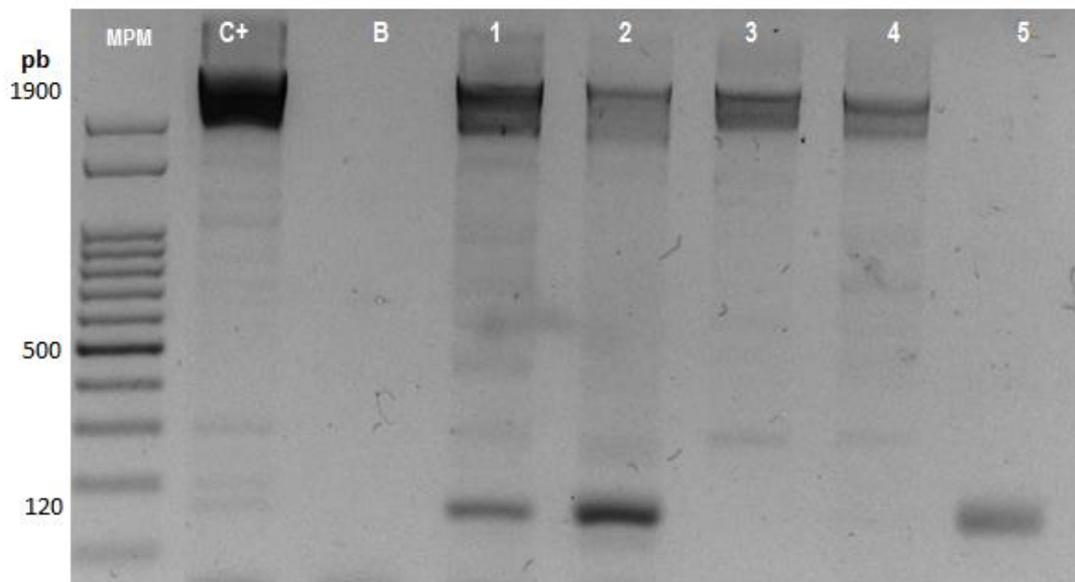


**Figura 40:** Determinación límite de detección PCR ADNk con diluciones sucesivas de parásitos. **A:** Extracción sin homogenización. **B:** Extracción con trituration mecánica.



**Figura 41:** Control de extracción de ADN a través de PCR 18S ARNr a hembras sin homogenización. **C+:** ADN de *Ny. neivai*. **B:** Blanco de reacción. **3-49:** Muestras elegidas aleatoriamente.

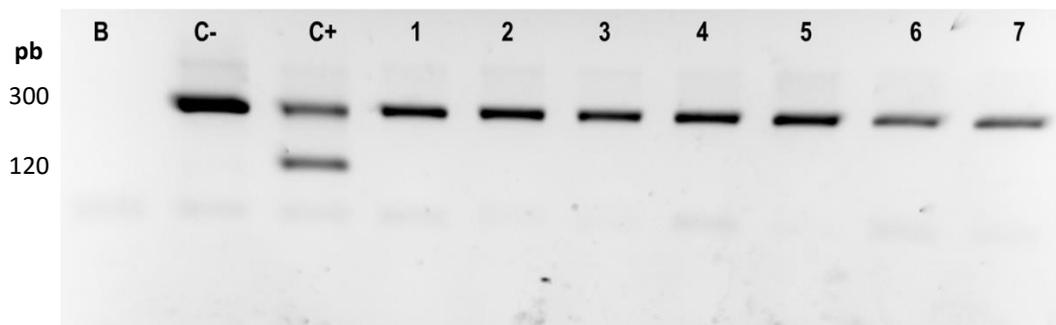
Cuando los *primers* de PCR ADNk fueron combinados con los *primers* del gen 18S ARNr de flebótomos para la búsqueda de infección natural, la PCR dúplex resultante presentó numerosas bandas inespecíficas entre el amplicón de flebótomos (~1900 pb) y el de *Leishmania* (120 pb) debido a las condiciones de amplificación (Figura 42), es por eso que el análisis de los pooles de hembras fue ejecutado finalmente con PCR dúplex de Actina.



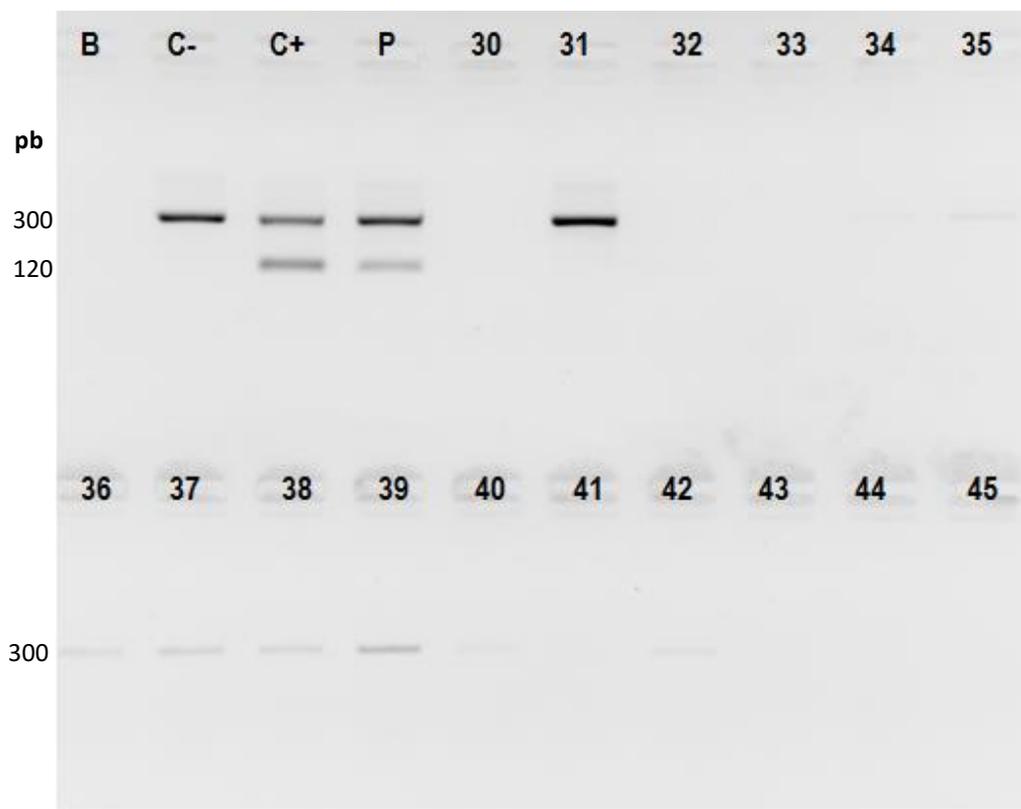
**Figura 42:** PCR dúplex ADNk-18S ARNr para detección de *Leishmania* spp. **C+:** ADN de *Ny. neivai*. **B:** Blanco de reacción. **1:** Pool artificial con 640 p/mL, **2:** Pool artificial con  $1,6 \cdot 10^4$  p/mL, **3:** Pool artificial con 5,12 p/mL, **4:** Pool artificial con 1,02 p/mL, **5:** ADN de cultivo de *L. (L.) amazonensis* 0,1 ng/ $\mu$ l.

La PCR dúplex ADNk-Actina permitió resolver los geles con mayor claridad y precisión por la ausencia de bandas inespecíficas, evitando arribar a falsos positivos (Figura 43). Los 167 pooles de hembras analizados con PCR dúplex ADNk- Actina resultaron negativos para *Leishmania* spp.

Aunque sólo el 5% de las hembras estuvo notoriamente alimentado, la mayoría de los pooles fueron positivos para Actina (300 pb) (Figura 44) demostrando ser éste un buen blanco para el control de extracción y amplificación de los pooles de hembras y resaltando la sensibilidad de la PCR Actina capaz de amplificar restos sanguíneos no visibles macroscópicamente.



**Figura 43:** PCR dúplex ADNk-Actina para detección de *Leishmania* spp. **B:** Blanco de reacción, **C-:** Sangre humana, **C+:** Raspaje de lesión de paciente leishmaniáisco, **1-7:** Pooles de hembras capturadas en barrio Taranto, positivos para Actina y negativos para *Leishmania* spp.



**Figura 44:** PCR dúplex ADNk-Actina para detección de *Leishmania* spp. **B:** Blanco de reacción, **C-:** Sangre humana, **C+:** Raspaje de lesión de paciente leishmaniáisco, **P:** Pool artificial con  $1,6 \cdot 10^4$  p/mL **30-45:** Pooles de hembras capturadas en barrio Taranto; todos ellos negativos para *Leishmania* spp., algunos positivos para Actina (31) y otros negativos (41).

## **DISCUSIÓN**

El diseño de medidas preventivas y de control de leishmaniasis en zonas endémicas requiere un entendimiento profundo de la epidemiología y ecología de la enfermedad. Para esto, es fundamental determinar qué especies de flebótomos se desempeñan como vectores y conocer la tasa de infección, asimismo poder tipificar los parásitos circulantes para compararlos con los aislados de pacientes y otros mamíferos (Ready, 2013).

La incriminación certera de vectores mediante métodos tradicionales representa un desafío complejo ya que la probabilidad de encontrar infección natural en flebótomos es muy baja. En Brasil, numerosos trabajos demostraron lo complicado y arduo que puede ser la búsqueda y detección de parásitos en flebótomos. En Ceará, en el año 1994 los insectos capturados presentaron una tasa de infección de 0,42% (44/10.612) (De Queiroz *et al.*, 1994); mientras que en Mato Grosso del Sur la tasa de infección fue del 0,15% (1/680) (Galati *et al.*, 1996). Por su parte, Da Silva & Grunewald, 1999, en la ciudad de Río Grande encontraron solo 3 hembras infectadas de las 920 que diseccionaron mientras que los parásitos no pudieron ser aislados por contaminación de los cultivos. Sin embargo, en otras investigaciones la búsqueda de infección no arrojó resultados positivos; Feitosa & Castellón, 2004, analizaron 375 hembras de 12 especies diferentes en el estado de Amazonas pero no encontraron ninguna hembra infectada; mientras que Silva & Gomes, 2001, en Sao Paulo capturaron 5.448 hembras que fueron diseccionadas, siendo todas negativas.

En concordancia con lo mencionado anteriormente, en este trabajo se diseccionaron 254 hembras para la búsqueda tradicional de parásitos en el departamento Orán y ninguna resultó positiva para infección por *Leishmania* spp., siendo que el 73% (186/254) de las analizadas estaban grávidas, lo que manifiesta que habían tenido ingestas sanguíneas (viéndose expuestas a una posible infección) para poder finalizar el ciclo gonotrófico. Sin embargo, las especies aquí capturadas (Tabla 7) fueron incriminadas como vectores en otros países o al menos demostraron la presencia de ADN parasitario en Argentina (Córdoba-Lanús *et al.*, 2006; de Carvalho *et al.*, 2010; Moya *et al.*, 2015; Pita-pereira *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2012).

Nuestros resultados, junto con los de trabajos previos que en la misma área de estudio obtuvieron resultados similares (Salomón *et al.*, 2004a), ponen de manifiesto que la tasa de infección natural de flebótomos tiende a ser baja a pesar de la elevada abundancia de vectores en zonas donde se reportan casos de leishmaniasis periódicamente. Es necesario destacar lo laborioso y demandante que son las disecciones de flebótomos y más aún el aislamiento de parásitos que requiere estrictas medidas de esterilidad y experiencia en la manipulación y cría de animales como hámsters que puedan garantizar la sobrevivencia y persistencia de los promastigotes infectantes (Caceres *et al.*, 2004; Paiva *et al.*, 2006).

De esta manera, se evidencian las ventajas que puede proporcionar un enfoque molecular a la búsqueda de infección natural, ya que técnicas como PCR tienen mayor sensibilidad y permiten analizar una mayor cantidad de flebótomos de manera simultánea y requiriendo menos tiempo al trabajar con pools de hembras (Carvalho *et al.*, 2008). Además los procedimientos moleculares basados en la detección de ADN hacen posible que los flebótomos sean almacenados en alcohol el tiempo necesario, a diferencia de los protocolos tradicionales de disección para los cuales las hembras deben ser almacenadas en nitrógeno líquido o ser llevadas a letargo para ser procesadas (REDILA, 2011; Salomón *et al.*, 2004a).

En este trabajo, 1.671 hembras capturadas en distintas zonas del departamento de Orán en los años 2015, 2016 y 2017 fueron analizadas para búsqueda de ADN de *Leishmania* spp. a través de PCR; todas ellas fueron negativas. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos en la normalización de la técnica se puede descartar la probabilidad de falsos negativos ya que cuando el límite de detección de la PCR ADNk fue determinado, la técnica demostró ser lo suficientemente sensible como para detectar el ADN de 25 promastigotes infectantes. Además, es posible afirmar que las extracciones de ADN y las PCR de pools de hembras fueron exitosas debido a la positividad de todas las PCR de gen 18S ARNr de flebótomos hechas a extracciones individuales elegidas aleatoriamente, como así también por la positividad para el gen de Actina de la mayoría de los pools analizados, demostrándose así la ausencia de inhibidores de PCR. Asimismo, los *primers*

para *Leishmania* spp. del sistema de PCR empleado en este trabajo fueron también usados en numerosos estudios previos con objetivos similares al de esta tesis (Marcondes *et al.*, 2009; Oliveira-pereira *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2008).

Para el análisis molecular de las hembras capturadas, si bien se trabajó con pooles de 10 individuos cada uno, se optó por hacer las extracciones de ADN individualmente. Estas fueron hechas a partir de flebótomos enteros para reducir la probabilidad de contaminación y porque no se observaron diferencias entre las extracciones hechas a hembras enteras y a hembras previamente maceradas con trituradores plásticos. Aunque investigaciones previas reportaron la presencia de inhibidores de PCR en la cabeza y tórax de flebótomos (Oliveira *et al.*, 2011), nuestros resultados demostraron lo contrario. También fue posible determinar que trabajar con ADN de 10 individuos, algunos de ellos alimentados (PCR de Actina positiva), no genera inhibición de PCR como anteriormente se había reportado (Paiva *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008). De esta manera se vuelve factible que la determinación de la tasa de infección sea exacta y precisa, porque en caso de encontrar un pool positivo, se pueden analizar individualmente los 10 flebótomos y conocer cuántos son los infectados. En cambio, normalmente se considera que la tasa de infección es la mínima probable asumiendo que un pool positivo sólo posee un flebótomo infectado (Miranda *et al.*, 2002; Paiva *et al.*, 2006).

Los pooles suelen estar compuestos por 3-50 flebótomos de acuerdo a lugar, fecha y trampa de captura (Garcia *et al.*, 2007; Martín-Sánchez *et al.*, 2006; Santamaría *et al.*, 2005); sin embargo, Moya *et al.*, 2015 mostraron que al menos 3 hembras infectadas fueron capturadas en un mismo gallinero, por esto se torna fundamental que las extracciones de ADN de hembras sean individuales para así evitar subestimar la tasa de infección del sitio analizado.

La ausencia de hembras infectadas con promastigotes, tanto en las disecciones como en las PCR del género *Leishmania* llevadas a cabo, resaltan características y particularidades de la leishmaniasis que fueron discutidas y establecidas en investigaciones previas. En estudios hechos a partir de entrenamientos militares, con el fin de determinar el tiempo de incubación de la

enfermedad, se observaron diferencias entre los valores de incidencia de unidades de soldados que habían tenido el mismo tiempo de exposición entrenando en áreas separadas por cientos de metros (Walton *et al.*, 1968; Sanchez *et al.*, 1992). Esto sugiere la existencia de microfocos, zonas de mayor riesgo que otras por presentar una alta concentración de vectores y reservorios. Estas áreas suelen ser producto de alteraciones antrópicas que generan pérdida de diversidad propiciando la proliferación de potenciales reservorios (Wasserberg *et al.*, 2003). En cercanías a la ciudad de San Ramón de la Nueva Orán (Abra Grande), el reporte del caso de 5 cazadores que resultaron infectados con lesiones múltiples luego de pasar algunas horas en un parche primario de vegetación, destaca la intensidad de exposición y riesgo de transmisión que tienen los microfocos (Krolewiecki *et al.*, 2013).

La presencia de microfocos o *hotspots*, cuya dinámica suele estar determinada por los reservorios, dificulta y vuelve azarosa la búsqueda de infección natural debido a la falta de homogeneidad en la distribución de vectores infectados (Miranda *et al.*, 2002; Vexenat *et al.*, 1986). En concordancia, un estudio previo donde se analizaron pequeñas áreas de un gran área mostró diferencias en las tasas de infección a pesar de existir similitud en la diversidad de flebótomos capturados, siendo en algunos sitios nula la tasa de infección mientras que en otros fue del 0,1%, 0,2% y 1,5% (Miranda *et al.*, 2002).

Es destacable la importancia que tienen los reservorios en la transmisión de la enfermedad y aunque muchas especies han sido estudiadas e incriminadas como tales, poco es lo que se conoce con certeza acerca de ellos (Ashford, 1996). Se ha propuesto que *Leishmania* spp. tiene reservorios múltiples, es decir la especie reservorio es en realidad un conjunto de multi-hospedadores que tienen diferentes y transitorios grados de transmisibilidad durante el ciclo infectivo (Haydon *et al.*, 2002). Estas enfermedades con sistemas de reservorios multi-especies, normalmente presentan reducciones en sus tasas de infección por el llamado “efecto de dilución” que está dado por la heterogeneidad en la capacidad de los hospedadores para soportar y garantizar la replicación del parásito y la durabilidad de la infección (Miller & Huppert, 2013). Es decir, los hospedadores menos competentes reducen el

contacto entre los vectores y los reservorios más aptos, disminuyendo entonces la tasa de infección en vectores y humanos.

En Brasil, Andrade *et al.*, 2015, fueron capaces de infectar experimentalmente con *L. (V.) braziliensis* 3 especies diferentes de roedores y por diferencias observadas en la carga parasitaria a través de qPCR y xenodiagnóstico concluyeron que las especies presentaban diferencias en su capacidad y competencia como reservorios. Recientemente, Fernández *et al.*, 2018, por primera vez en Argentina, reportaron la presencia de ADN de *L. (V.) braziliensis* en 2 especies silvestres de pequeños roedores a través de PCR-RFLP. Ambos trabajos soportan la idea de reservorios múltiples para el mantenimiento de *L. (V.) braziliensis*. En este contexto la ausencia de hembras infectadas en nuestros resultados puede deberse a que en el departamento de Orán, por la presencia de reservorios múltiples, tiene lugar el efecto de dilución que disminuye la probabilidad de encuentro y contacto efectivo entre vector y la especie reservorio de mayor aptitud, sumándose a esto que el efecto de dilución se ve influenciado e incluso potenciado si los vectores tienen preferencias alimentarias por el hospedador de menor capacidad de transmisión o bien si los vectores no tienen preferencias alimentarias; *Ny. neivai*, la especie más abundante en la zona (Tabla 7, Tabla 8) no ha mostrado tener preferencias alimentarias definidas siendo más bien una especie oportunista (Dias-Sversutti *et al.*, 2007; Marassá *et al.*, 2013).

Hasta el momento se desconocen con certeza las especies de mamíferos que actúan como reservorios en el departamento de Orán, aun habiéndose capturado y analizado 100 ejemplares de roedores y marsupiales durante los años 2015 y 2018 en diferentes zonas como las ciudades Colonia Santa Rosa, Hipólito Yrigoyen y Aguas Blancas; también, en los parajes Abra Grande, Media Luna y El Tabacal y en el barrio el Cedral de SRNO. En los muestreos, se capturaron 6 géneros diferentes, *Akodon* (3 especies), *Calomys* (4 especies), *Galea* sp., *Oligoryzomys* (3 especies), *Rattus* sp., y *Thylamys* (2 especies) y las especies *Euryoryzomys legatus*, *Holochilus chacarius* y *Oxymycterus paramensis*; en ninguno de ellos se encontró infección natural por PCR y cultivo (Hoyos CL, comunicación personal). Esto resalta la necesidad de intensificar los esfuerzos para la determinación de reservorios en la zona. El

abordaje no debería ser solo molecular, ya que aunque estos métodos son capaces de detectar ADN parasitario, terminan siendo insuficientes para definir la importancia epidemiológica de la especie en el mantenimiento de los parásitos (Roque & Jansen, 2014).

No se deben perder de vista las limitaciones que tienen los estudios moleculares para la determinación de reservorios. Estos métodos no son capaces de distinguir hospedadores incidentales que no intervienen en la transmisión. Básicamente, la detección de ADN en mamíferos no es suficiente para que se los considere reservorios, se requieren estudios eco-epidemiológicos y parasitológicos que prueben su capacidad para transmitir parásitos a otros mamíferos a través de vectores. Es importante también determinar si los potenciales reservorios tienen un tiempo de supervivencia suficiente para desarrollar una carga parasitaria que infecte vectores y asimismo, determinar también, la duración de la infección en la especie mamífera estudiada (Acardi *et al.*, 2013; Chaves *et al.*, 2007).

En resumen, en el departamento de Orán no se conoce con certeza qué especies de flebótomos se desempeñan como vectores de la leishmaniasis, por lo que es necesario continuar con la captura y búsqueda de infección natural para una mejor caracterización de la transmisión microfocal. Se considera fundamental y necesaria la combinación de métodos tradicionales y moleculares para el estudio de vectores. Técnicas como PCR permiten procesar en menor tiempo una gran cantidad de flebótomos y aportan mayor sensibilidad y especificidad al diagnóstico, lo que adquiere importancia ya que algunas especies de flebótomos son hospedadores de otros protozoos como *Trypanosoma* spp. y *Endotrypanum* spp. (Arias *et al.*, 1985; Christensen & Herrer, 1976; Kato *et al.*, 2010). Además existe la posibilidad de que a partir de la extracción de ADN de hembras, los parásitos sean tipificados sin necesidad de recurrir a al aislamiento parasitario tradicional (Kato *et al.*, 2005). Sin embargo, es importante destacar que un resultado positivo de PCR, no es suficiente para la incriminación de vectores; la capacidad vectorial tiene que ser evaluada experimentalmente y a través de disecciones que demuestren la colonización parasitaria del intestino de la hembra (Bates, 2007). Así, se podrá descartar que se trate de ingestas recientes a partir de animales infectados y

evitar llegar a conclusiones erróneas ya que existen antecedentes en los que se ha reportado la presencia de ADN de *Leishmania* spp. en algunos flebótomos que no son sus vectores, y que de hecho son incapaces de admitir su desarrollo hasta las formas infectivas (Latrofa *et al.*, 2018).

**CAPÍTULO 5: ESTANDARIZACIÓN  
DE MÉTODOS MOLECULARES  
PARA TIPIFICACIÓN DE  
*LEISHMANIA* SPP.**

## **INTRODUCCIÓN**

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias causadas por flagelados del género *Leishmania*. Para aquellas especies que tienen reservorios mamíferos, el género se divide en tres subgéneros: *Leishmania*, *Viannia* y *Mundinia* (Espinosa *et al.*, 2016; Paranaíba *et al.*, 2017; Rioux *et al.*, 1990), siendo los dos primeros responsables de las leishmaniasis humanas. El subgénero *Sauroleishmania* incluye a las especies parásitas de reptiles (Killick-Kendrick *et al.*, 1986).

La técnica patrón para la tipificación de *Leishmania* spp. es Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) la cual se basa en el análisis del patrón de movilidad de al menos 15 enzimas. Sin embargo, es una técnica extremadamente laboriosa, que requiere grandes cantidades de parásitos y tiene bajo poder de resolución en estudios evolutivos debido a mutaciones silenciosas (Boerlin, 1997; Marco *et al.*, 2005). Es por esto, que distintos métodos moleculares basados en ADN, fueron desarrollados para optimizar la tipificación de parásitos de *Leishmania* spp. (Locatelli *et al.*, 2014; Marco *et al.*, 2006), y también para estudiar la variabilidad génica y relaciones filogenéticas de las especies (Marco *et al.*, 2015).

A partir de aislados de pacientes con LTA, en el departamento de Orán se determinó la presencia de las especies *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) panamensis* (Frank *et al.*, 2003; Locatelli *et al.*, 2014; Marco *et al.*, 2012, 2005). Además, recientemente la especie *L. (L.) infantum* fue identificada como especie infectante en casos de leishmaniasis visceral y de leishmaniosis canina (Barrio *et al.*, 2012; Barroso *et al.*, 2015a, 2015b). La especie *L. (V.) braziliensis* tiene la mayor prevalencia en la zona y se demostró que presenta variabilidad genética, habiéndose revelado la existencia de dos zymodemas a través de ensayos isoenzimáticos y, también, la existencia de dos genotipos, por medio de PCR-secuenciación de genes (Locatelli *et al.*, 2014; Marco *et al.*, 2006, 2005).

Para estudios de incriminación vectorial, como lo establece el criterio número 4, además de identificar la especie parasitaria, resulta fundamental caracterizar a los parásitos para determinar si la variante genética presente en

flebótomos es la misma que la que infecta humanos (Ready, 2013). En este contexto, se buscó normalizar métodos moleculares dependientes de ADN para la tipificación de parásitos de *Leishmania* spp., como así también para el análisis de su variabilidad intraespecífica.

## **OBJETIVOS**

- ✓ Estandarizar el sistema PCR-RFLP del gen de la “proteína heat-shock 70” (hsp70) para la tipificación de los parásitos de *Leishmania* spp.
- ✓ Estandarizar la PCR del gen de citocromo *b* para tipificación de *Leishmania* spp. y genotipificación.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Estandarización de PCR y RFLP de proteína heat-shock 70 (PCR-hsp70):** Los *primers* usados fueron F25: 5' GGACGCCGGCAGGATTKCT 3' y R1310: 5' CCTGGTTGTTGTTTCAGCCACTC 3' (Montalvo *et al.*, 2012), cuyo target es una región de ADN codificante para una proteína de shock térmico ampliamente conservada entre procariotas y eucariotas tanto en estructura como en función. La proteína de shock térmico de 70 kDa (hsp 70) es citoplasmática y actúa como chaperona, encargándose del plegamiento y transporte de otras proteínas (Fraga *et al.*, 2010).

El producto de PCR es de ~1286 pb y para optimizar su amplificación, se trabajó con un gradiente creciente de temperatura, de 55°C a 61°C, para elegir la T° de *annealing*. Siendo que con valores de T° mayores a 59°C hubo mejor amplificación, se llevó a cabo un nuevo gradiente de T° (59°C-61°C), evaluándose en forma simultánea las concentraciones de primers de 0,2 y 0,4 µM.

Para la normalización de la PCR y RFLP de hsp 70, se trabajó con cultivo de parásitos de las cepas de *L. (L.) infantum* (MCAN/AR/10/NNP4), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/AR/99/JDM1) y *L. (V.) braziliensis* (MHOM/AR/03/OLO1), con concentración de 1 ng/µl. En resumen, el ADN de *Leishmania* fue extraído mediante lavados sucesivos con buffer de lisis (10 mM Tris-HCl, 0,32 M sacarosa, Tritón X100 1% y 5 mM MgCl<sub>2</sub>) y una incubación a 56°C por 3 horas en buffer de detergentes no iónicos conteniendo 60 µg/mL de Proteinasa K, lo que permitió eliminar la hemoglobina y componentes celulares que pudieran interferir en la reacción de PCR.

Finalmente, los ensayos de restricción se llevaron a cabo con la enzima HaeIII (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen), de acuerdo a lo propuesto por Montalvo *et al.*, 2012. Como control positivo de cada reacción se usó ADN de *L. (V.) braziliensis* y agua Mili Q para el blanco de reacción. Después de la amplificación, los productos de PCR se sembraron en geles de agarosa al 1% y los de restricción en geles de agarosa al 2% para corridas electroforéticas que

fueron reveladas bajo luz ultravioleta después de la tinción con GelRed (Genbiotech, Argentina).

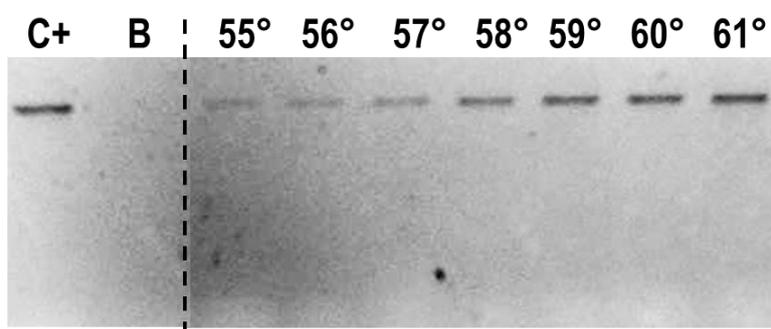
**Estandarización de PCR de citocromo *b* (PCR-cyt *b*):** Los *primers* usados fueron L-Cyt-S: 5' GGTGTAGGTTTTAGTYTAGG 3' y L-Cyt-R: 5' CTACAATAAACAAATCATAATATRCAATT 3' (Kato *et al.*, 2010a), cuyo target es el gen de citocromo *b* que forma parte de los maxicírculos del kinetoplasto parasitario y codifica la subunidad catalítica de una enzima presente en la cadena respiratoria (Luyo-Acero *et al.*, 2004).

El producto de PCR es de ~800 pb y para la normalización se modificó el protocolo de amplificación propuesto por Kato *et al.*, 2010a reduciéndose el tiempo de desnaturalización inicial y de extensión final a 5 minutos cada uno. Simultáneamente se redujo la concentración de primers a 0,7 µM. Debido a la presencia de bandas inespecíficas, se redujo nuevamente la concentración de primers a 0,3 µM; también, se evaluaron diferentes T° de *annealing*: 54°C a 56°C, variando en 0,5 °C.

Para la normalización de PCR-cyt *b*, se trabajó con cultivos de cepas tipificadas previamente como *L. (L.) infantum* (MCAN/AR/10/NNP4) y *L. (V.) braziliensis* (MHOM/AR/03/OLO1), respectivamente, en concentración de 1 ng/µl. Como control positivo de cada reacción se usó ADN de *L. (V.) braziliensis* y agua Mili Q para el blanco de reacción. Después de la amplificación, los productos de PCR se sembraron en geles de agarosa al 1% para corridas electroforéticas y fueron revelados bajo luz ultravioleta después de la tinción con GelRed (Genbiotech, Argentina).

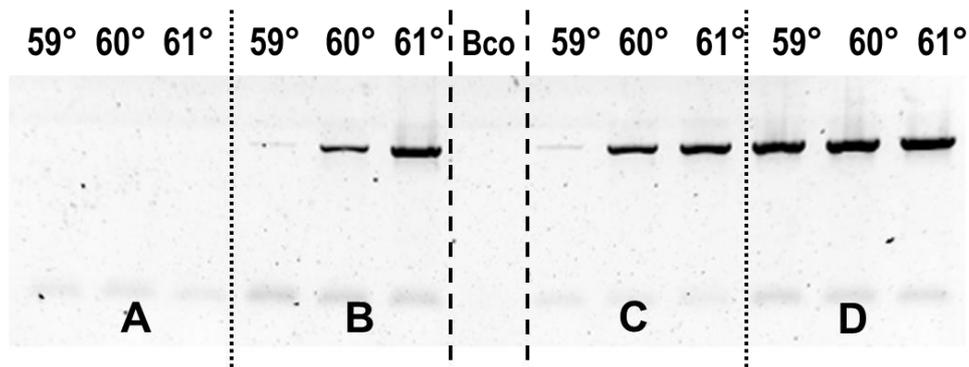
## RESULTADOS

Para la normalización de PCR-hsp70, se hizo un gradiente creciente de T° (55°-61°) con ADN de cultivo de *L. (V.) braziliensis* para determinar la temperatura de *annealing* capaz de producir bandas de amplicones gruesas y nítidas. Se observó que al igual que lo propuesto por Montalvo *et al.*, 2012, 61°C produjo una mejor amplificación (Figura 45).



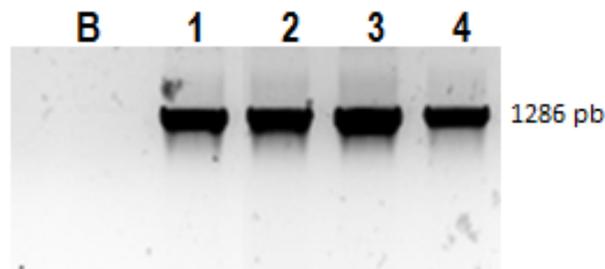
**Figura 45:** PCR-hsp70 con gradiente de T° 55°-61 para cultivo de *Leishmania (V.) braziliensis*. **C+:** ADN de *L. (V.) braziliensis* a 61°. **B:** Blanco de reacción.

Luego, se llevó a cabo un nuevo gradiente de temperatura alrededor de los 61°C (por haber sido este el valor de T° que produjo mayor amplificación) y en simultáneo se probaron distintas concentraciones de *primers* (0,2 y 0,4 µM) para la amplificación de hsp70 en *L. (V.) braziliensis* y de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269). Se observó que la combinación óptima de condiciones fue la concentración de *primers* 0,4 µM y temperatura de *annealing* de 61°C para ambas muestras (Figura 46).



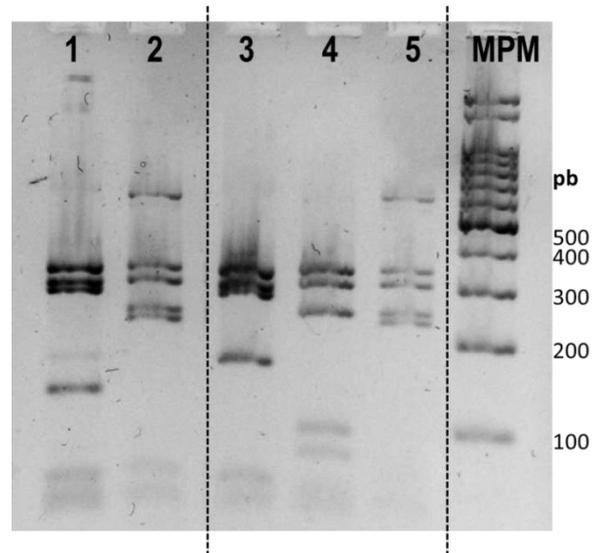
**Figura 46:** PCR-hsp70 con gradiente de T° 59°-61. **A y B:** ADN de *L. (V.) braziliensis*, con 0,2 y 0,4 μM de primers, respectivamente. **C y D:** ADN de *L. (L.) amazonensis*, con 0,2 y 0,4 μM de primers, respectivamente.

Bajo estas condiciones se llevó a cabo exitosamente la amplificación de cultivos de las cepas *L. (V.) guyanensis* (MHOM/AR/99/JDM1), *L. (V.) braziliensis* (MHOM/AR/03/OLO1), *L. (L.) infantum* (MCAN/AR/10/NNP4) y *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) (Figura 47).

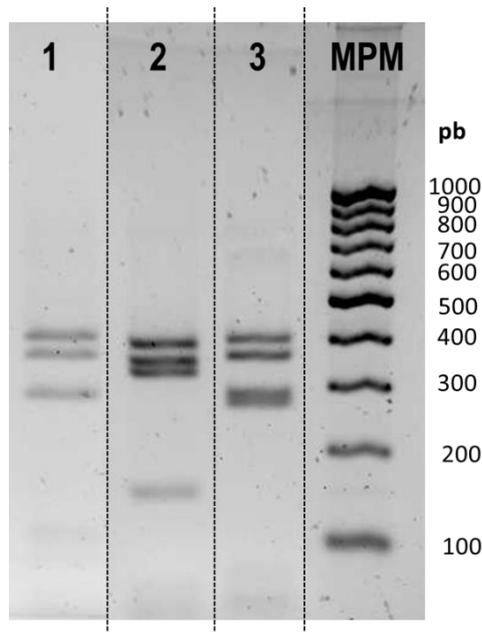


**Figura 47:** PCR-hsp70 de muestras diversas. **B:** blanco de reacción. **1:** *L. (V.) guyanensis* MHOM/AR/99/JDM1. **2:** *L. (V.) braziliensis* MHOM/AR/03/OLO1. **3:** *L. (L.) infantum* MCAN/AR/10/NNP4. **4:** *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/73/M2269.

Los patrones de restricción obtenidos con la enzima HaeIII fueron especie-específicos, idénticos a los reportados por Montalvo *et al.*, 2012 (Figuras 48 y 49).



**Figura 48:** PCR-RFLP de hsp70. **1:** *L. (V.) braziliensis* MHOM/AR/03/OLO1. **2:** *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/73/M2269**3:** *L. (V.) guyanensis* MHOM/AR/99/JDM1. **4:** *L. (L.) infantum* MCAN/AR/10/NNP4. **5:** *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/73/M2269. **MPM:** Marcador de peso molecular 100 pb.



**Figura 49:** PCR-RFLP de hsp70 de cepas de referencia. **1:** *L. (L.) infantum* MCAN/AR/10/NNP4. **2:** *L. (V.) braziliensis* MHOM/AR/03/OLO1. **3:** *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/73/M2269. **MPM:** Marcador de peso molecular 100 pb.

La PCR-cyt b tiene como finalidad la amplificación y posterior secuenciación de una región de ADN de ~800 pb; en este capítulo se abordó únicamente la normalización de la PCR. Partiendo de las condiciones de ciclado propuestas por Kato *et al.*, 2010a y Locatelli *et al.*, 2014, se hicieron distintos ajustes.

**Condiciones de Kato *et al.*, 2010a y Locatelli *et al.*, 2014**

Desnaturalización Inicial: 94° x 10'

Desnaturalización: 95° x 1'

Annealing: 55° x 1'

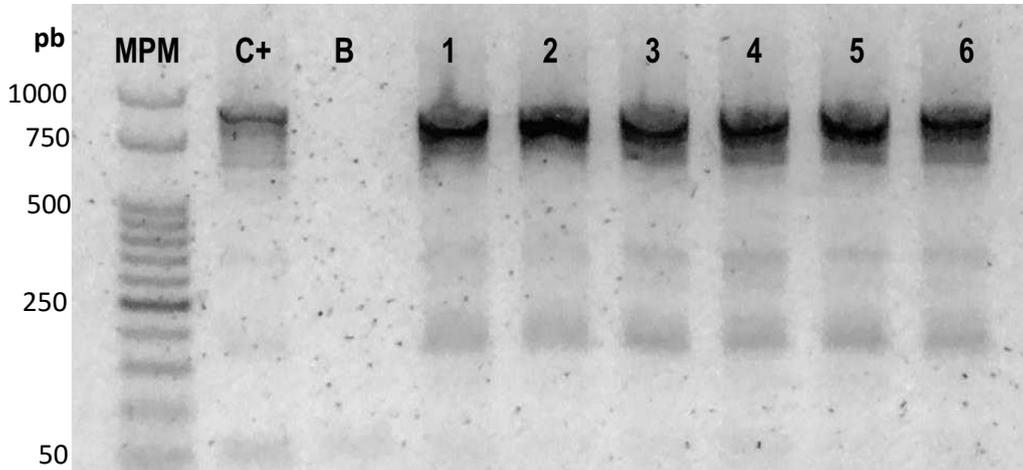
Extensión: 72° x 1'

} 35 ciclos

[primers]: 1 µM

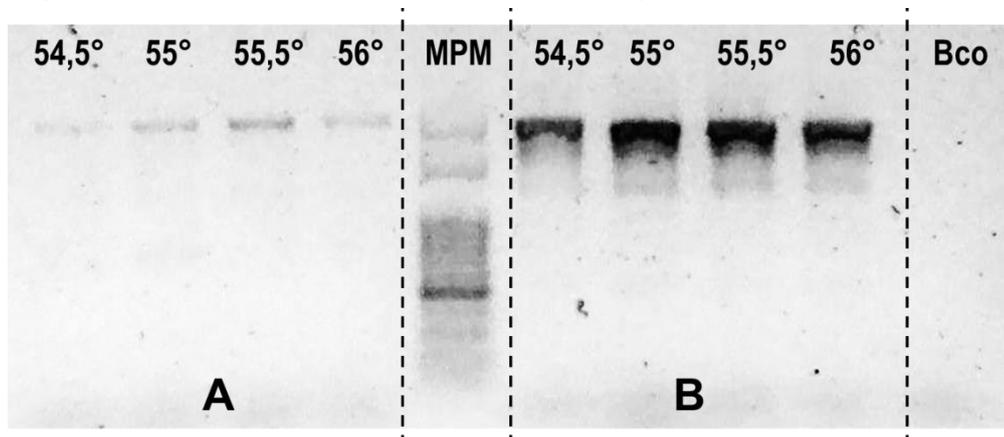
Extensión Final: 72° x 7'

Para ADN extraído de cultivo, se redujo la concentración de *primers* a 0,7  $\mu\text{M}$ , la desnaturalización inicial se redujo a 5' y la extensión final también a 5'. Aunque hubo amplificación de ADN parasitario, se observaron numerosas bandas inespecíficas (Figura 50).



**Figura 50:** PCR-cyt b: **C+:** ADN de *L. (V.) braziliensis* amplificado según Kato et al., 2010. **B:** Blanco de reacción. **1-6:** Cultivos de *L. (V.) braziliensis*. **MPM:** marcador de peso molecular 50 pb.

Para eliminar las bandas inespecíficas se amplificó ADN de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/AR/03/OLO1) y de *L. (L.) infantum* (MCAN/AR/10/NNP4). En este experimento se redujo el tiempo de *annealing* a 45", la concentración de *primers* a 0,3  $\mu\text{M}$  y se amplificó con un gradiente de  $T^\circ$  alrededor de los 55°C (propuesto en el protocolo original), variando en 0,5°C. Así, las bandas inespecíficas fueron eliminadas y se determinó que la temperatura óptima de *annealing* para ambas especies fue de 55,5 °C (Figura 51).



**Figura 51:** PCR-cyt b con gradiente de  $T^\circ$  54,5°-56°. **A:** ADN de *L. (L.) infantum*. **B:** ADN de *L. (V.) braziliensis*. **Bco:** Blanco de reacción. **MPM:** Marcador de peso molecular.

Las condiciones finales de los sistemas PCR-RFLP de hsp70 y de PCR-cyt b optimizados se detallan en la Tabla 9.

Proceso	Condiciones		Referencia
PCR-cyt b	<ul style="list-style-type: none"> <li><u>Primers:</u>  <b>L-Cyt-S:</b> 5' GGTGTAGGTTTTAGTYTAGG 3'  <b>L-Cyt-R:</b> 5' CTACAATAAACAAATCATAATATRCAATT 3'</li> </ul>		Kato <i>et al.</i> , 2010a; Locatelli <i>et al.</i> , 2014
	<ul style="list-style-type: none"> <li><u>Condiciones de Ciclado:</u>  <b>Desnat. Inicial:</b> 94°C, 3'            35 ciclos:            *Desnat.: 95°C, 45"            *Annealing: 55,5° C, 45"            *Extensión: 72°C, 1'  <b>Extensión final:</b> 72°C, 5'</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><u>Concentraciones Finales:</u>  <b>Volumen final de reacción:</b> 15 µl            Templado: 2 µl             Buffer de PCR: 1x<sup>1</sup>            Cl<sub>2</sub>Mg: 1,5 mM<sup>1</sup>            dNTPs: 0,2 mM<sup>2</sup>            Primers: 0,3 µM<sup>3</sup>            Taq Polimerasa: 1,25 U<sup>1</sup></li> </ul>	
PCR-hsp70	<ul style="list-style-type: none"> <li><u>Primers:</u>  <b>F25:</b> 5' GGACGCCGGCACGATTKCT 3'  <b>R1310:</b> 5' CCTGGTTGTTGTTTCAGCCACTC 3'</li> </ul>		Montalvo <i>et al.</i> , 2012
	<ul style="list-style-type: none"> <li><u>Condiciones de Ciclado:</u>  <b>Desnat. Inicial:</b> 94°C, 2'            35 ciclos:            *Desnat.: 95°C, 30"            *Annealing: 61° C, 1'            *Extensión: 72°C, 1:20'  <b>Extensión final:</b> 72°C, 3'</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><u>Concentraciones Finales:</u>  <b>Volumen final de reacción:</b> 15 µl            Templado: 2 µl             Buffer de PCR: 1x<sup>1</sup>            Cl<sub>2</sub>Mg: 1,5 mM<sup>1</sup>            dNTPs: 0,2 mM<sup>2</sup>            Primers: 0,4 µM<sup>3</sup>            Taq Polimerasa: 1,25 U<sup>1</sup></li> </ul>	
RFLP-hsp70	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Enzima HaeIII<sup>4</sup></b>  <ul style="list-style-type: none"> <li><u>Concentraciones Finales:</u>  <b>Volumen final de reacción:</b> 30 µl            Amplicones: 7,5 µl             Buffer R 10X: 1x<sup>4</sup>            Enzima HaeIII: 1 U<sup>4</sup></li> </ul> </li> <li><u>Digestión:</u> 37°C, 3 hs</li> <li><u>Inactivación:</u> 80°C, 20'</li> </ul>		

**Tabla 9:** Condiciones de PCR-cyt b y PCR-hsp70 para la tipificación de *Leishmania* spp.

<sup>1</sup>: GoTaq Promega. Biodynamics, Argentina. <sup>2</sup>: Embiotec, Argentina. <sup>3</sup>: Genbiotech, Argentina. <sup>4</sup>: Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Argentina.

## **DISCUSIÓN**

Las leishmaniasis representan un problema creciente y severo para la salud pública. Este conjunto de enfermedades comprenden un amplio espectro de manifestaciones clínicas que incluyen la leishmaniasis visceral (LV), la leishmaniasis cutánea (LC), la leishmaniasis mucocutánea (LMC) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) (Desjeux, 2004; Reithinger *et al.*, 2007). En América, LC, LMC y LCD juntas conforman la leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) (Grimaldi & Tesh, 1993).

En el norte de la provincia de Salta, de acuerdo a las características clínicas de los pacientes diagnosticados a diario en el IIET y según estudios previos, las formas de enfermedad que predominan son la LC y la LMC compatibles con la infección causada por *L. (V.) braziliensis* (Barrio *et al.*, 2009; Chiaramonte *et al.*, 1996; Sosa-Estani *et al.*, 1998). Esto a su vez coincide con tipificaciones parasitarias hechas previamente en la zona, en las cuales la especie de mayor prevalencia fue *L. (V.) braziliensis* (Locatelli *et al.*, 2014; Marco *et al.*, 2012, 2005). Sin embargo, las especies *L. (V.) guyanensis* y *L. (L.) amazonensis* también fueron aisladas e identificadas a partir de pacientes la zona (Frank *et al.*, 2003; Locatelli *et al.*, 2014; Marco *et al.*, 2006).

La mayoría de los métodos empleados para el estudio molecular de parásitos están dirigidos al análisis de la variabilidad interespecífica, sin considerar que las especies presentan variabilidad intraespecífica (Marco *et al.*, 2005). Para la incriminación vectorial es fundamental identificar la especie infectante y también poder caracterizar los parásitos y determinar si los genotipos presentes en los vectores coinciden con aquellos aislados a partir de humanos y reservorios (Ready, 2013).

Los dos sistemas de PCR estandarizados en este capítulo, fueron capaces de amplificar ADN parasitario de todas las especies de *Leishmania* spp. reportadas en el país, por lo que el potencial de la combinación de ambas PCR resulta prometedor, siendo la PCR-hsp70 una alternativa simple y rápida para la identificación de especies; y, siendo la PCR-cyt b capaz de genotipificar parásitos. Esto resulta fundamental para profundizar el conocimiento y la

caracterización epidemiológica de la zona, a través de la incriminación real de vectores y reservorios que actualmente tienen carácter putativo; además podría complementar el diagnóstico de pacientes. Esta información sería valiosa y primordial para la delimitación de zonas de riesgo, para el diseño de medidas preventivas y de vigilancia epidemiológica en la región más endémica de LTA en el país.

# **CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES**

La LTA es endémica en diez provincias argentinas (Salomón *et al.*, 2012), considerándose el departamento de Orán de la provincia de Salta una región hiperendémica (Krolewiecki *et al.*, 2017; Salomón *et al.*, 2008b). En esta zona, *Ny. neivai* fue reportado como vector sospechado de *L. (V.) braziliensis* (Marco *et al.*, 2005; Salomón *et al.*, 2004b) y los reservorios de los parásitos responsables de la LTA se desconocen hasta el momento.

Para el estudio de los vectores potenciales de LTA que circulan en el departamento de Orán, en este trabajo se hicieron capturas de flebótomos en diferentes zonas de riesgo de transmisión en los años 2015, 2016 y 2017. En todos los sitios muestreados la diversidad de especies fue homogénea y la de mayor prevalencia en la comunidad de flebótomos fue *Ny. neivai*.

Con la finalidad de realizar una tipificación molecular de flebótomos, se normalizó la PCR y RFLP del gen 18S ARNr. Como resultado, se determinaron patrones especie-específico para *Ny. neivai*, *Mg. migonei*, complejo *cortelezzii* (*Ev. cortelezzii*) y *Pa. shannoni*, que fueron validados por la clasificación morfológica tradicional. Debido a la eficiencia de la técnica se sugiere su incorporación para estudios similares por la ventaja que brinda en relación a procesar un mayor número de flebótomos en menor tiempo y por haber sido capaz de identificar ejemplares que la metodología tradicional no pudo debido a la ruptura o pérdida de estructuras taxonómicas. Para continuar con la validación de la combinación PCR-RFLP 18S ARNr se requieren muestreos adicionales en nuevas áreas para confirmar la especificidad de los patrones de restricción y para la identificación molecular de otras especies de flebótomos.

Para la búsqueda de infección natural, se capturaron y diseccionaron 254 hembras en 5 sitios periurbanos de Orán. Aunque las trampas fueron puestas en el peridomicilio de viviendas emplazadas en barrios con reporte frecuente de casos de mujeres y menores de 14 años, la inspección de los intestinos de las hembras fue negativa. Esto resulta concordante con trabajos similares previamente realizados en zonas endémicas del norte de Salta y otros países en los cuales no se encontraron parásitos durante el análisis de un número de hembras incluso de un orden mayor magnitud (Silva & Gomes, 2001; Salomón *et al.*, 2004).

Ante la necesidad de buscar infección por *Leishmania* spp. a través de técnicas más sensibles y que permitieran procesar un mayor número de flebótomos, se puso a punto una PCR ADNk cuya sensibilidad fue de 25 promastigotes por flebótomos infectados artificialmente con cultivo de parásitos. Posteriormente, la PCR ADNk se combinó con PCR del gen de actina para la detección de ADN de *Leishmania* spp. en pools de 10 hembras. A través de la PCR dúplex resultante se analizaron 1.671 hembras, siendo todas negativas para infección por *Leishmania* spp. Sin embargo, se pone de manifiesto que el sistema de PCR dúplex ADNk-actina representa una herramienta útil, necesaria y práctica para el monitoreo de vectores independizándose de las disecciones de hembras para búsqueda de infección natural que son extremadamente laboriosas y suelen llevar a la subestimación de la tasa de infección (Paiva *et al.*, 2007)

Para fortalecer el abordaje molecular de flebótomos hembras, es decir identificar molecularmente la especie de flebótomo como así también determinar la presencia de ADN de parasitario a partir de la extracción casera de ADN de hembras sin homogenizar; se estandarizaron dos sistemas de PCR capaces de tipificar los parásitos en caso de que alguna hembra estuviera infectada. Las PCR-hsp70 y PCR-cyt b fueron puestas a punto con cepas de *Leishmania* de referencia, con la finalidad de identificar de manera veloz la especie infectante a través de RFLP de PCR-hsp 70. Posteriormente, a través de PCR-cyt b es posible estudiar la variabilidad intraespecífica de los parásitos, lo que resulta primordial en la real incriminación vectorial, ya que los aislados de flebótomos deben ser idénticos a los de humanos (Ready, 2013). La combinación de las dos PCR representa la posibilidad de tipificar parásitos sin tener que recurrir a los análisis de isoenzimas que son complejos, laboriosos y dependientes de cultivos de parásitos, que a su vez son demandantes y propensos a la contaminación (Marco *et al.*, 2006; Montalvo *et al.*, 2012).

La ausencia de hembras positivas para infección por *Leishmania* spp. (en búsqueda de infección por disección y por PCR), resalta la baja tasa de infección de los vectores de LTA cuya transmisión es de carácter microfocal (Krolewiecki *et al.*, 2013) y es modulada por la presencia y dinámica de reservorios (Ashford, 1996) que hasta el momento se desconocen en la zona

de estudio. De esta manera, adquiere importancia el estudio de la abundancia y distribución de flebótomos como indicadores de zonas de riesgo de transmisión microfocal.

En consecuencia, en dos sitios periurbanos de SRNO colindantes a parches de vegetación secundaria, se hicieron muestreos durante los años 2016 y 2017 para determinar la variación estacional de flebótomos. En el sitio 1 (N. Taranto), los meses de mayor abundancia de hembras de *Ny. neivai* fueron noviembre y junio; mientras que en el sitio 2, (El Cedral), las hembras de *Ny. neivai* fueron más abundantes en agosto. A su vez los meses de mayor gravidez de hembras fueron noviembre (sitio 1) y febrero (sitio 2). Esta información puede contribuir a determinar las épocas del año en que deben reforzarse las medidas de prevención.

Los resultados de esta tesis y lo que particularmente aquí se discute, genera la necesidad de continuar con la búsqueda de infección natural a través de disecciones de hembras, como así también a través de PCR dúplex ADNk-actina para profundizar la caracterización epidemiológica de la zona. Se considera que es una justificada y valiosa perspectiva futura desarrollar muestreos longitudinales de flebótomos para llevar a cabo análisis de series temporales que permitan conocer la variación y asociación de abundancia de flebótomos respecto a variables climáticas (temperatura, humedad, precipitaciones). De esta manera, se podrían focalizar medidas de control, antes de los picos esperados de abundancia de flebótomos.

Finalmente, se espera que los aportes de esta tesis y trabajos futuros contribuyan, principalmente, a reforzar y mejorar la planificación, promoción y ejecución de medidas preventivas como por ejemplo regular las actividades laborales o recreativas desarrolladas en bosques primarios, definir los sitios de descanso de los trabajadores y fomentar el uso de ropa impregnada con repelente durante la jornada laboral. También, sería necesario desarrollar programas educativos que propicien el uso de repelente durante las épocas de mayor abundancia de flebótomos, aborden el manejo de la basura orgánica para evitar el desarrollo de criaderos de flebótomos en las viviendas humanas y que inculquen hábitos como distanciar los sitios de cría de animales de los

dormitorios, entre otros, que resultan imprescindibles y necesarios para áreas hiperendémicas como lo es departamento de Orán.

# ANEXO I

*Fecha y noches de captura para cada sitio muestreado.*

TRAMPA	SITIO	FECHA MES AÑO (DÍA)	NOCHES DE CAPTURA
SHANNON	1 (CEDRAL)	Abril 2016 (12, 13, 14) Abril 2017 (28)	3 1
	2 (TARANTO)	Diciembre 2016 (15) Febrero 2017 (22, 24) Abril 2017 (26, 27)	1 2 2
	3 (BASURAL MUNICIPAL)	Abril 2015 (15)	1
	5 (HIPÓLITO YRIGOYEN)	Abril 2015 (16)	1
	6 (B° 6 DE ENERO)	Septiembre 2017 (5, 6, 7) Noviembre 2017 (10)	3 1
CDC	1 (CEDRAL)	2016 Marzo (15) Mayo (28) Julio (27) Agosto (31) Septiembre (21) Noviembre (23) Diciembre (29)	1 por mes
	2 (TARANTO)	Diciembre 2016 (14, 15, 16) Febrero 2017 (21, 22, 24) Abril 2017 (26, 27) Junio 2017 (26, 27) Septiembre 2017 (5,6, 7) Noviembre 2017 (8, 10)	3 3 2 2 3 2
	3 (BASURAL MUNICIPAL)	Abril 2015 (15)	1
	4 (TABACAL AGROINDUSTRIA)	Abril 2015 (16, 17)	2
	7 (ABRA GRANDE)	Diciembre 2015 (14, 15, 16)	3

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Acardi, S.A., Liotta, D.J., Santini, M.S., Romagosa, C.M., Salomón, O.D., 2010. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera : Psychodidae : Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina : the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 796–799.
- Acardi, S.A., Rago, M. V., Liotta, D.J., Fernandez-Duque, E., Salomón, O.D., 2013. *Leishmania* (*Viannia*) DNA detection by PCR-RFLP and sequencing in free-ranging owl monkeys (*Aotus azarai azarai*) from Formosa, Argentina. *Vet. Parasitol.* 193, 256–259. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.012>
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D., 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–40. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Al-Dakhil, A.A., Al-Ajmi, R.A., Siddiqi, N.J., Ayaad, T.H., 2016. Molecular typing of phlebotomine sand flies in al-madinah and asir regions, Saudi Arabia using PCR–RFLP of 18S ribosomal RNA gene. *Saudi J. Biol. Sci.* 24, 1697–1703. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.014>
- Ampuero, J., Urdeneta, M., de Oliveira Macêdo, V., 2005. Factores de riesgo para la transmisión de leishmaniasis cutánea en niños de 0 a 5 años en un área endémica de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Cad. Saude Pública*, Rio Janeiro 21, 161–170. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2005000100018>
- Andrade, M.S., Courtenay, O., Maria, M.E., Carvalho, F.G., Carvalho, A.W.S., Soares, F., Carvalho, S.M., Costa, P.L., Zampieri, R., Floeter-Winter, L.M., Shaw, J.J., Brandão-Filho, S.P., 2015. Infectiousness of Sylvatic and Synanthropic Small Rodents Implicates a Multi-host Reservoir of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004137>
- Aransay, A.M., Scoulica, E., Chaniotis, B., Tselentis, Y., 1999. Typing of sandflies from Greece and Cyprus by DNA polymorphism of 18S rRNA gene. *Insect Mol. Biol.* 8, 179–184.
- Aransay, A.M., Scoulica, E., Tselentis, Y., Ready, P.D., 2000. Phylogenetic relationships of phlebotomine sandflies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA. *Insect Mol. Biol.* 9, 157–168. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00168.x>
- Arias, J.R., Miles, M.A., Naiff, R.D., Pova, M.M., de Freitas, R.A., Biancardi, C.B., Castellon, E.G., 1985. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): Isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 1098–1108. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1985.34.1098>
- Ashford, R.W., 2007. Disease as a stabilizing factor in the protection of landscape: The leishmaniasis as models. *Ecohealth* 4, 99–103. <https://doi.org/10.1007/s10393-006-0077-x>
- Ashford, R.W., 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 14, 523–532. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(96\)00041-7](https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00041-7)
- Barrio, A.B., Garcia Bustos, M.F., Mora, M.C., Parodi, C.M., Ramos, F., Moreno, S., Basombrío, M.A., 2009. Identificación por PS-PCR de especies de *Leishmania* y su correlación con características clínicas, epidemiológicas y terapéuticas en Salta, Argentina. *Rev. Argentina Salud Pública* 1, 30–33.
- Barrio, A.B., Parodi, C.M., Locatelli, F.M., Mora, M.C., Basombrío, M.A., Korenaga, M., Hashiguchi, Y., Garcia Bustos, M.F., Gentile, A., Marco, J.D., 2012. *Leishmania infantum* and Human Visceral Leishmaniasis, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 354–355.
- Barroso, P.A., Marco, J.D., Kato, H., Tarama, R., Rueda, P., Cajal, S.P., Basombrío, M. a, Korenaga, M., Taranto, N.J., Hashiguchi, Y., 2007. The identification of sandfly species, from an area of Argentina with endemic leishmaniasis, by the PCR-based analysis of the

gene coding for 18S ribosomal RNA. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 101, 247–253.  
<https://doi.org/10.1179/136485907X156988>

- Barroso, P.A., Marco, J.D., Locatelli, F.M., Cardozo, R.M., Hoyos, C.L., Mora, M.C., Garca Bustos, M.F., Lopez-Quiroga, I., Mimori, T., Gentile, A.G., Barrio, A.B., Korenaga, M., Hashiguchi, Y., Basombro, M.A., 2015a. Visceral leishmaniasis caused by *leishmania infantum* in salta, Argentina: Possible reservoirs and vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93, 334–339. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0267>
- Barroso, P.A., Nevot, M.C., Hoyos, C.L., Locatelli, F.M., Lauthier, J.J., Ruybal, P., Cardozo, R.M., Russo, P.D., Vassiliades, C.N., Mora, M.C., Estévez, J.O., Hashiguchi, Y., Korenaga, M., Basombro, M.A., Marco, J.D., 2015b. Genetic and clinical characterization of canine leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* in northeastern Argentina. *Acta Trop.* 150, 218–223. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.007>
- Bates, P.A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* 37, 1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Bates, P.A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* 37, 1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Beati, L., Cáceres, A.G., Lee, J.A., Munstermann, L.E., 2004. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 34, 225–234.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.10.012>
- Becker, N., Huber, K., Pluskota, B., Kaiser, A., 2011. *Ochlerotatus japonicus japonicus* – a newly established neozoon in Germany and a revised list of the German mosquito fauna. *Eur. Mosq. Bull.* 29, 88–102.
- Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L.F., Jaffe, C.L., 2006. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1435–1439.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1435>
- Bergsten, J., Bilton, D.T., Fujisawa, T., Elliott, M., Monaghan, M.T., Balke, M., Hendrich, L., Geijer, J., Herrmann, J., Foster, G.N., Ribera, I., Nilsson, A.N., Barraclough, T.G., Vogler, A.P., 2012. The effect of geographical scale of sampling on DNA barcoding. *Syst. Biol.* 61, 851–869. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys037>
- Boerlin, P., 1997. Applications of multilocus enzyme electrophoresis in medical microbiology. *J. Microbiol. Methods* 28, 221–231. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(97\)00010-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(97)00010-9)
- Bravo, A.G., Quintana, M.G., Abril, M., Salomón, O.D., 2013. The first record of *Lutzomyia longipalpis* in the Argentine northwest. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 1071–1073.  
<https://doi.org/10.1590/0074-0276130358>
- Bruschi, F., Gradoni, L., 2018. *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*, Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0_5)
- Caceres, A.G., Villaseca, P., Dujardin, J.C., Bañuls, A.L., Inga, R., Lopez, M., Arana, M., Le Ray, D., Arevalo, J., 2004. Epidemiology of Andean cutaneous leishmaniasis: Incrimination of *Lutzomyia ayacuchensis* (Diptera: Psychodidae) as a vector of *Leishmania* in geographically isolated, upland valleys of Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 607–612.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0267> [pii]
- Carvalho, G.M.L., Andrade-Filho, J.D., Falcão, A.L., Rocha Lima, A.C.V.M., Gontijo, C.M.F., 2008. Naturally Infected *Lutzomyia* Sand Flies in a *Leishmania* -Endemic Area of Brazil. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 8, 407–414. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0180>
- Chamberlin, J., Laughlin, L.W., Romero, S., Solórzano, N., Gordon, S., Andre, R.G., Pachas, P., Friedman, H., Ponce, C., Watts, D., 2002. Epidemiology of Endemic *Bartonella bacilliformis*: A Prospective Cohort Study in a Peruvian Mountain Valley Community. *J.*

Infect. Dis. 186, 983–990. <https://doi.org/10.1086/344054>

- Chaves, L.F., Añez, N., 2004. Species co-occurrence and feeding behavior in sand fly transmission of American cutaneous leishmaniasis in western Venezuela. *Acta Trop.* 92, 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.08.001>
- Chaves, L.F., Hernandez, M.J., Dobson, A.P., Pascual, M., 2007. Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 23, 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.05.003>
- Chiaramonte, M.G., Zwirner, N.W., Caropresi, S.L., Heredia, V., Taranto, N.J., Malchiodi, E.L., 1996. Estudio de casos de leishmaniasis en la Provincia de Salta. Evidencias de infección mixta por *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp. *Med. (Buenos Aires)* 56, 259–268.
- Christensen, H.A., Herrero, A., 1976. Neotropical sand flies (Diptera: psychodidae), invertebrate hosts of *Endotrypanum schaudinni* (Kinetoplastida: trypanosomatidae). *J. Med. Entomol.* 13, 299–303. <https://doi.org/10.1093/jmedent/13.3.299>
- Copa, G.N., Almazán, M.C., Aramayo, L. V., Krolewiecki, A.J., Cajal, S.P., Juárez, M., Lauthier, J.J., Korenaga, M., Barroso, P., Nasser, J.R., Marco, J.D., Gil, J.F., 2018. Tegumentary leishmaniasis and sandflies in a border area between Argentina and Bolivia Griselda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1–10. [https://doi.org/10.1016/0038-1098\(79\)91043-3](https://doi.org/10.1016/0038-1098(79)91043-3)
- Córdoba-Lanús, E., Lizarralde De Grosso, M., Piñero, J.E., Valladares, B., Salomón, O.D., 2006. Natural infection of *Lutzomyia neivai* with *Leishmania* spp. in northwestern Argentina. *Acta Trop.* 98, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.11.010>
- Cuba Cuba, C., 2000. Diagnostico Parasitologico De La Leishmaniasis Tegumentaria Americana. *Rev Med Exp* 17, 1–4. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342012000300002>
- Da Silva, O.S., Grunewald, J., 1999. Contribution to the Sand Fly Fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* (Viannia) Infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 579–582. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000500002>
- de Carvalho, M.R., Valença, H.F., da Silva, F.J., de Pita-Pereira, D., de Araújo Pereira, T., Britto, C., Brazil, R.P., Filho, S.P.B., 2010. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Trop.* 116, 108–110. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.009>
- De Lima, H., De Guglielmo, Z., Rodríguez, A., Convit, J., Rodríguez, N., 2002. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. in Lara State, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 169–174. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000200004>
- de Pita-Pereira, D., Alves, C.R., Souza, M.B., Brazil, R.P., Bertho, Á.L., de Figueiredo Barbosa, A., Britto, C.C., 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99, 905–913. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.019>
- de Pita-Pereira, D., Cardoso, M.A.B., Alves, C.R., Brazil, R.P., Britto, C., 2008. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop.* 107, 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.015>
- De Queiroz, R.G., Vasconcelos, I.D.A.B., Vasconcelos, A.W., Pessoa, F.A.C., De Sousa, R.N., David, J.R., 1994. Cutaneous Leishmaniasis in Ceara State in Northeastern Brazil: Incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) as a Vector of *Leishmania braziliensis* in Baturite Municipality. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 693–698. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.693>

- Degrave, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U., 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 463–469.
- Depaquit, J., 2014. Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: Review and perspectives. *Infect. Genet. Evol.* 28, 744–756. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.027>
- Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F., Andry, P.E., Peyrefitte, C., 2010. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveill.* 15, 19507. <https://doi.org/10.2807/ese.15.10.19507-en>
- Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305–318. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>
- Desjeux, P., 2001a. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95, 239–243.
- Desjeux, P., 2001b. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol.* 190, 77–79. <https://doi.org/10.1007/s004300100085>
- Dias-Sversutti, A.D.C., Scodro, R.B.D.L., Reinhold-Castro, K.R., Neitzke, H.C., Teodoro, U., 2007. Estudo preliminar da preferência alimentar de *Nyssomyia neivai* (Pinto) e *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Diptera: Psychodidae) em área rural do Paraná. *Neotrop. Entomol.* 36, 953–959. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2007000600019>
- du Breuil, R.M., Patel, J.M., Mendelow, B. V., 1993. Quantitation of beta-actin-specific mRNA transcripts using xeno-competitive PCR. *PCR Methods Appl.* 57–59.
- Espinosa, O.A., Serrano, M.G., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., Shaw, J.J., 2016. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology* 1–13. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002092>
- Feitosa, M.A.C., Castellón, E.G., 2004. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. II. Estratificação horizontal. *Acta Amaz.* 34, 121–127.
- Fenwick, A., 2012. The global burden of neglected tropical diseases. *Public Health* 126, 233–236. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2011.11.015>
- Fernández, M.S., Frascina, J., Acardi, S., Liotta, D.J., Lestani, E., Giuliani, M., Busch, M., Salomón, O.D., 2018. Assessment of the role of small mammals in the transmission cycle of tegumentary leishmaniasis and first report of natural infection with *Leishmania braziliensis* in two sigmodontines in northeastern Argentina. *Parasitol. Res.* 117, 405–412. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5714-5>
- Field, K.G., Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Ghiselin, M.T., Raff, E.C., Pace, N.R., Raff, R.A., 1988. Molecular Phylogeny of the Animal Kingdom. *Science* (80-. ). 239, 748–752.
- 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. *Infect. Genet. Evol.* 10, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007>
- Frank, F.M., Fernandez, M.M., Taranto, N.J., Cajal, S.P., Margni, R.A., Castro, E., Thomaz-Soccol, V., Malchiodi, E., 2003. Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitology* 126, 31–39.
- Galati, E.A.B., Nunes, V.L.B., Dorval, M.E.C., Oshiro, E.T., Cristaldo, G., Espíndola, M.A.,

- Rocha, H.C. da, Garcia, W.B., 1996. Estudo dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), em área de leishmaniose tegumentar, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil TT - Study of the phlebotomines (Diptera, Psychodidae), in area of cutaneous leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Rev. Saude Publica* 30, 115–128. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101996000200002>
- Garcia, A.L., Tellez, T., Parrado, R., Rojas, E., Bermudez, H., Dujardin, J., 2007. Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis : molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. *R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101, 1208–1213. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.09.002>
- Gil, J.F., Nasser, J.R., Cajal, S.P., Juarez, M., Acosta, N., Cimino, R.O., Diosque, P., Krolewiecki, A.J., 2010. Urban transmission of american cutaneous leishmaniasis in Argentina: Spatial analysis study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 433–440. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0113>
- Grimaldi, G., Tesh, R.B., 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 230–250. <https://doi.org/10.1128/CMR.6.3.230.Updated>
- Haydon, D.T., Cleaveland, S., Taylor, L.H., Laurenson, M.K., 2002. Identifying Reservoirs of Infection: A Conceptual and Practical Challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1468–1473. <https://doi.org/10.3201/eid0812.010317>
- Herrer, A., Christensen, H.A., 1975. Implication of Phlebotomus Sand Flies as Vectors of Bartonellosis and Leishmaniasis as early as 1764. *Science* (80- ). 190, 154–155.
- Jorquera, A., González, R., Marchán-Marcano, E., Oviedo, M., Matos, M., 2005. Multiplex-PCR for detection of natural Leishmania infection in Lutzomyia spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 45–48. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000100008>
- Kamhawi, S., 2006. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 22, 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.06.012>
- Kamhawi, S., Molyneux, D.H., Killick-Kendrick, R., Milligan, P.J., Phillips, A., Wilkes, T.J., Killick-Kendrick, M., 1987. Two populations of Phlebotomus ariasi in the Cévennes focus of leishmaniasis in the south of France revealed by analysis of cuticular hydrocarbons. *Med. Vet. Entomol.* 1, 97–102.
- Karimkhani, C., Wang, V., Coffeng, L.E., Naghavi, P., Dellavalle, R.P., Naghavi, M., 2016. Global burden of cutaneous leishmaniasis : a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect. Dis.* 16, 1–8. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00003-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00003-7)
- Kato, H., Cáceres, A.G., Mimori, T., Ishimaru, Y., Sayed, A.S.M., Fujita, M., Iwata, H., Uezato, H., Velez, L.N., Gomez, E.A.L., Hashiguchi, Y., 2010a. Use of FTA cards for direct sampling of patients' lesions in the ecological study of cutaneous leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3661–3665. <https://doi.org/10.1128/JCM.00498-10>
- Kato, H., Gomez, E.A., Cáceres, A.G., Uezato, H., Mimori, T., Hashiguchi, Y., 2010b. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 814–826. <https://doi.org/10.3390/ijerph7030814>
- 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 324–329. <https://doi.org/77/2/324> [pii]
- Kato, H., Uezato, H., Katakura, K., Calvopiña, M., Marco, J.D., Barroso, P.A., Gomez, E.A., Mimori, T., Korenaga, M., Iwata, H., Nonaka, S., Hashiguchi, Y., 2005. Detection and

- identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 87–93. <https://doi.org/72/1/87> [pii]
- Kato, H., Uezato, H., Sato, H., Bhutto, A.M., Soomro, F.R., Baloch, J.H., Iwata, H., Hashiguchi, Y., 2010c. Natural infection of the sand fly *Phlebotomus kazeruni* by *Trypanosoma* species in Pakistan. *Parasit. Vectors* 3, 10. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-10>
- Kerr, S.F., Emmons, L.H., Melby, P.C., Liu, C., Perez, L.E., Villegas, M., Miranda, R., 2006. *Leishmania amazonensis* infections in *Oryzomys acritus* and *Oryzomys nitidus* from Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 1069–1073. <https://doi.org/75/6/1069> [pii]
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279–289. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(99\)00046-2](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(99)00046-2)
- Killick-Kendrick, R., 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.* 4, 1–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00255.x>
- Killick-Kendrick, R., Lainson, R., Rioux, J.A., Safjanova, V.M., 1986. The taxonomy of *Leishmania*-like parasites of reptiles. *Leishmania. Taxon. phylogenèse. Appl. éco-épidémiologiques.* 143–148.
- Krolewiecki, A.J., Almazan, M.C., Quipildor, M., Juarez, M., Gil, J.F., Espinosa, M., Canabire, M., Cajal, S.P., 2017. Reappraisal of Leishmanin Skin Test (LST) in the management of American Cutaneous Leishmaniasis: A retrospective analysis from a reference center in Argentina. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005980>
- Krolewiecki, A.J., Gil, J.F., Quipildor, M., Cajal, S.P., Pravia, C., Juarez, M., Villalpando, C., Locatelli, F.M., Chanampa, M., Castillo, G., Oreste, M.F., Hoyos, C.L., Negri, V., Nasser, J.R., 2013. Restricted outbreak of American tegumentary leishmaniasis with high microfocal transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88, 578–582. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0475>
- Lainson, R., Ward, R.D., Shaw, J.J., 1977. *Leishmania* in Phlebotomid Sandflies: VI. Importance of Hindgut Development in Distinguishing between Parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* Complexes. *Proc. R. Soc.* 199, 300–320. <https://doi.org/10.1098/rspb.1977.0141>
- Lane, R.P., Crosskey, R.W., 1994. *Medical insects and arachnids*, Springer Science+Business Media. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90403-0](https://doi.org/10.1016/0169-4758(94)90403-0)
- Latrofa, M.S., Iatta, R., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Gabrielli, S., Pombi, M., Gradoni, L., Otranto, D., 2018. Detection of *Leishmania infantum* DNA in phlebotomine sand flies from an area where canine leishmaniasis is endemic in southern Italy. *Vet. Parasitol.* 253, 39–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.006>
- Le Prince, J.A., Orenstein, A., 1916. Mosquito control in Panama, the eradication of malaria and yellow fever in Cuba and Panama. G.P. PUTNAM's SONS.
- Locatelli, F.M., Cajal, S.P., Barroso, P.A., Lauthier, J.J., Mora, M.C., Juarez, M., Kato, H., Nasser, J.R., Hashiguchi, Y., Korenaga, M., Marco, J.D., 2014. The isolation and molecular characterization of *Leishmania* spp. from patients with American tegumentary leishmaniasis in northwest Argentina. *Acta Trop.* 131, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.015>
- Luyo-Acero, G.E., Uezato, H., Oshiro, M., Takei, K., Kariya, K., Katakura, K., Gomez-Landires, E., Hashiguchi, Y., Nonaka, S., 2004. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology* 128, 48304–91. <https://doi.org/10.1017/S0031182004004792>
- Marassá, A.M., Galati, E.A.B., Bergamaschi, D.P., Consales, C.A., 2013. Blood feeding patterns of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychodidae) in a cutaneous

- leishmaniasis endemic area of the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 46, 547–554. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0168-2013>
- Marco, J.D., Barroso, P.A., Calvopiña, M., Kumazawa, H., Furuya, M., Korenaga, M., Cajal, S.P., Mora, M.C., Rea, M.M.J., Borda, C.E., Basombrío, M.A., Taranto, N.J., Hashiguchi, Y., 2005. Species assignation of *Leishmania* from human and canine American tegumentary leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in north Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 606–611. <https://doi.org/72/5/606> [pii]
- Marco, J.D., Barroso, P.A., Locatelli, F.M., Cajal, S.P., Hoyos, C.L., Nevot, M.C., Lauthier, J.J., Tomasini, N., Juarez, M., Estévez, J.O., Korenaga, M., Nasser, J.R., Hashiguchi, Y., Ruybal, P., 2015. Multilocus sequence typing approach for a broader range of species of *Leishmania* genus: Describing parasite diversity in Argentina. *Infect. Genet. Evol.* 30, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.12.031>
- Marco, J.D., Barroso, P.A., Mimori, T., Locatelli, F.M., Tomatani, A., Mora, M.C., Cajal, S.P., Nasser, J.R., Parada, L.A., Taniguchi, T., Korenaga, M., Basombrío, M.A., Hashiguchi, Y., 2012. Polymorphism-specific PCR enhances the diagnostic performance of American tegumentary leishmaniasis and allows the rapid identification of *Leishmania* species from Argentina. *BMC Infect. Dis.* 12, 191.
- Marco, J.D., Uezato, H., Mimori, T., Barroso, P.A., Korenaga, M., Nonaka, S., Basombrío, M.A., Taranto, N.J., Hashiguchi, Y., 2006. Are cytochrome B gene sequencing and polymorphism-specific polymerase chain reaction as reliable as multilocus enzyme electrophoresis for identifying *Leishmania* spp. from Argentina? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 256–260. <https://doi.org/75/2/256> [pii]
- Marcondes, C., Bittencourt, I.A., Stoco, P.H., Eger, I., Grisard, E., Steindel, M., 2009. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania* (*Viannia*) spp. in Brazil. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania* (Via. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 1093–1097. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.12.006>
- Marcondes, C.B., 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations for Phlebotomine sandflies (Diptera:Psychodidae:phlebotominae) of the world. *Entomol. News* 118, 493–496. [https://doi.org/10.3157/0013-872X\(2007\)118](https://doi.org/10.3157/0013-872X(2007)118)
- Martín-Sánchez, J., Gállego, M., Barón, S., Castillejo, S., Morillas-Marquez, F., 2006. Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100, 527–532. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.08.005>
- Miller, E., Huppert, A., 2013. The effects of host diversity on vector-borne disease: the conditions under which diversity will amplify or dilute the disease risk. *PLoS One.* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080279>
- Miranda, J.C., Reis, E., Schriefer, A., Gonçalves, M., Galvão, M., Carvalho, L., Fernandes, O., Barral-netto, M., Barral, A., 2002. Frequency of Infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian Endemic Area as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 185–188.
- Montalvo, A.M., Fraga, J., Maes, I., Dujardin, J.-C., Van Der Auwera, G., 2012. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 1453–1461. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1463-z>
- Moya, S.L., Giuliani, M.G., Manteca Acosta, M., Salomón, O.D., Liotta, D.J., 2015. First description of *Migonemyia migonei* (Franca) and *Nyssomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) (Psychodidae: Phlebotominae) natural infected by *Leishmania infantum* in Argentina. *Acta Trop.* 152, 181–184. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.09.015>
- Moya, S.L., Giuliani, M.G., Santini, M.S., Quintana, M.G., Salomón, O.D., Liotta, D.J., 2017.

- Leishmania infantum DNA detected in phlebotomine species from Puerto Iguazú City , Misiones province , Argentina. *Acta Trop.* 172, 122–124. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.05.004>
- Nadim, A., Amini, H., 1970. The effect of antimalaria spraying on the transmission of zoonotic cutaneous leishmaniasis. *Trop. Geogr. Med.* 479–481.
- Nájera, J.A., González-Silva, M., Alonso, P.L., 2011. Some lessons for the future from the global malaria eradication programme (1955-1969). *PLoS Med.* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000412>
- Oliveira-pereira, Y.N., Rebêlo, J.M.M., Pinto Moraes, J.L., Ferreira Pereira, S.R., 2006. Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotomíneos ( Psychodidae , Lutzomyia ) por Leishmania sp na Amazônia maranhense Molecular diagnosis of the natural infection rate due to Leishmania sp in sandflies ( Psychodidae , Lutzomyia ) in the. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39, 540–543.
- Oliveira, D., Reinhold-castro, K.R., Bernal, M., Legriffon, C., Lonardon, M., Teodoro, U., Silveira, T., 2011. Natural Infection of Nyssomyia neivai by Leishmania ( Viannia ) spp. in the State of Paraná, Southern Brazil, detected by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11, 137–143. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0218>
- OMS, 2017. Respuesta Mundial para el Control de Vectores 2017-2030, Organización Mundial de la Salud. Proyecto de respuesta mundial para el control de vectores 2017–2030.
- Paiva, B.R., Secundino, N.F.C., Nascimento, J.C., Pimenta, P.F.P., Galati, E.A.B., Andrade Junior, H.F., Malafronte, R.S., 2006. Detection and identification of Leishmania species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop.* 99, 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.08.009>
- Paiva, B.R., Secundino, N.F.C., Pimenta, P.F.P., Galati, E.A.B., Andrade Junior, H.F., Malafronte, R.S., 2007. Padronização de condições para detecção de DNA de Leishmania spp. em flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) pela reação em cadeia da polimerase. *Cad Saude Publica* 23, 87–94.
- Paranaíba, L.F., Pinheiro, L.J., Torrecilhas, A.C., Macedo, D.H., Menezes-Neto, A., Tafuri, W.L., Soares, R.P., 2017. Leishmania enriettii (Muniz & Medina, 1948): A highly diverse parasite is here to stay. *PLoS Pathog.* 13, 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006303>
- Pedrosa, F.D.A., Ximenes, R. de A., 2009. Sociodemographic and Environmental Risk Factors for American Cutaneous Leishmaniasis ( ACL ) in the State of Alagoas , Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 195–201.
- Pita-pereira, D., Souza, G.D., Zwetsch, A., Alves, C.R., Britto, C., Rangel, E.F., 2009. Short Report : First Report of Lutzomyia ( Nyssomyia ) neivai ( Diptera : Psychodidae : Phlebotominae ) Naturally Infected by Leishmania ( Viannia ) braziliensis in a Periurban Area of South Brazil Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 593–595.
- Quintana, M., Salomón, O., Guerra, R., Lizarralde De Grosso, M., Fuenzalida, A., 2012. Phlebotominae of epidemiological importance in cutaneous leishmaniasis in northwestern Argentina: Risk maps and ecological niche models. *Med. Vet. Entomol.* 27, 39–48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01033.x>
- Quintana, M.G., Salomón, O.D., De Grosso, M.S.L., 2010. Distribution of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in a Primary Forest-Crop Interface, Salta, Argentina. *J. Med. Entomol.* 47, 1003–1010. <https://doi.org/10.1603/ME09072>
- Ready, P.D., 2013. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>
- REDILA, R. de I. de las L. en A., 2011. Actas Segunda Reunión Red de Investigación de las

- Leishmaniasis en Argentina, in: REDILA. Anexo 1. pp. 24–25.
- Reithinger, R., Dujardin, J., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 581–596. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2011.01844.x>
- Remy-Kristensen, A., Perrotey, S., Pesson, B., Garcia-Stoeckel, M., Ferte, H., Morillas-Marquez, F., Leger, N., 1996. *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917: Morphological and isoenzymatic comparisons of two natural populations from Tenerife (Canary Islands, Spain) and Crete (Greece). *Parasitol. Res.* 82, 48–51. <https://doi.org/10.1007/s004360050067>
- Rioux, J., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J., 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of Isoenzymes. Suggestions for a New Classification. *Ann. Parasitol. Hum* 65, 111–125. <https://doi.org/10.1051/parasite/1990653111>
- Roque, A.L.R., Jansen, A.M., 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 3, 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>
- Rosa, J., Pereira, D.P., Brazil, R.P., Filho, J.D.A., Salomón, O., Szelag, E., 2012. Natural infection of *cortelezzii* complex (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with *Leishmania braziliensis* in Chaco, Argentina. *Acta Trop.* 123, 128–131. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.04.008>
- Salomón, O.D., Acardi, S.A., Liotta, D.J., Fernández, M.S., Lestani, E., López, D., Mastrángelo, A. V., Figueroa, M., Fattore, G., 2009. Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis in the Iguazú falls area of Argentina. *Acta Trop.* 109, 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.08.002>
- Salomón, O.D., Mastrángelo, A.V., Quintana, M.G., Rosa, J., 2011. Leishmaniasis and Environment in Argentina : An Eco-Epidemiological Approach, in: *Encyclopedia of Environmental Health*. pp. 481–490.
- Salomón, O.D., Orellano, P.W., Quintana, M.G., Perez, S., Sosa-Estani, S., Acardi, S., Lamfri, M., 2006. Transmision de la leishmaniasis tegumentaria en la Argentina. *Med. (Buenos Aires)* 66, 211–219.
- Salomón, O.D., Quintana, M.G., 2011. Leishmaniasis y ambiente: Uso de sensores remotos y sistemas de información geográfica, in: *Temas de Zoonosis V*. Buenos Aires, pp. 175–187.
- Salomón, O.D., Quintana, M.G., Bezzi, G., Morán, M.L., Betbeder, E., Valdéz, D. V., 2010. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda, Argentina. *Acta Trop.* 113, 84–87. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.08.024>
- Salomón, O.D., Quintana, M.G., Mastrángelo, A.V., Fernández, M.S., 2012. Leishmaniasis and climate change-Case study: Argentina. *J. Trop. Med.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/601242>
- Salomón, O.D., Quintana, M.G., Rosa, J., 2008a. Eco-epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Argentina. *Soc. Iberoam. Inf. Científica* 1–8.
- Salomón, O.D., Quintana, M.G., Zaidenberg, M., 2008b. Urban distribution of Phlebotominae in a cutaneous leishmaniasis focus, Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 282–287. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000016>
- Salomón, O.D., Sinagra, A., Nevot, M.C., Barberian, G., Paulin, P., Estevez, J.O., Riarte, A., Estevez, J., 2008c. First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 109–111. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100018>
- Salomón, O.D., Sosa-Estani, S., Canini, L., Córdoba-Lanús, E., 2001. LEISHMANIOSIS

TEGUMENTARIA EN UN AREA CON NIVELES EPIDEMICOS DE TRANSMISION, SALTA, ARGENTINA, 1998. *Med. (Buenos Aires)* 61, 284–290.

- Salomón, O.D., Wilson, M.L., Munstermann, L.E., Travi, B.L., 2004a. Spatial and Temporal Patterns of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in a Cutaneous Leishmaniasis Focus in Northern Argentina. *J. Med. Entomol.* 41, 33–39. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.1.33>
- Sanchez, J.L., Diniega, B.M., Small, J.W., Miller, R.N., Andujar, J.M., Weina, P.J., Lawyer, P.G., Ballou, W.R., Lovelace, J.K., 1992. Epidemiologic investigation of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in a defined geographic focus of transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 47–54.
- Santamaría, E., Ponce, N., Puerta, C., Ferro, C., 2005. Validación de la PCR en la detección de parásitos *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) como herramienta en la definición de especies vectores. *Biomedica* 25, 271–279.
- Saraiva, L., Carvalho, G.M.L., Gontijo, C.M.F., Quaresma, P.F., da Rocha Lima, A.C.V.M., Falcão, A.L., Andrade-Filho, J.D., 2009. Natural Infection of *Lutzomyia neivai* and *Lutzomyia sallesi* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in Brazil. *J. Med. Entomol.* 46, 1159–1163.
- Scarpassa, V.M., Alencar, R.B., 2012. *Lutzomyia umbratilis*, the main vector of leishmania guyanensis, represents a novel species complex? *PLoS One* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037341>
- Scodro, R.B. de L., Reinhold-Castro, K.R., Sversutti, A. de C.D., Neitzke-Abreu, H.C., Membrive, N. de A., Kühn, J.B., Silveira, T.G.V., Teodoro, U., 2008. Investigation of Natural Infection by *Leishmania* in Sandflies of Paraná State, Southern Brazil. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 51, 483–491.
- Seyedi-Rashti, M.A., Nadim, A., 1975. Re-establishment of cutaneous leishmaniasis after cessation of antimalaria spraying. *Trop. Geogr. Med.* 79–82.
- Silva, A.C., Gomes, A.C., 2001. Estudo da competência vetorial de *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Vianna, 1911. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34, 187–191. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822001000200006>
- Silva, E.A., Andreotti, R., Dias, E.S., Barros, J.C., Brazuna, J.C.M., 2008. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Exp. Parasitol.* 119, 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.03.011>
- Sosa-Estani, S., Campanini, A., Sinagra, A., Luna, C., Peralta, M., Coutada, V., Medina, L., Riarte, A., Salomon, D., Gomez, A., Segura, E., 1998. Clinical features and diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis in patients of an endemic area in Salta. *Med. (Buenos Aires)* 58, 685–691.
- Sosa-Estani, S., Segura, E.L., Gomez, A., Salomón, O.D., Peralta, M., Coutada, V., Ruiz, L.M., 2001. Leishmaniose cutânea no Norte da Argentina. Fatores de risco identificados num estudo caso-coorte em três municípios de Salta Cutaneous leishmaniasis in Northern Argentina. Identification of risk. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34, 511–517.
- Sosa-Estani, S., Segura, E.L., Salomón, O.D., Gómez, A., Peralta, M., Coutada, V., Ruiz, L.M., 2000. Tegumentary leishmaniasis in Northern Argentina: distribution of infection and disease, in three municipalities of Salta, 1990-1992. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33, 573–582. <https://doi.org/S0037-86822000000600009> [pii]
- Szelag, E.A., Quintana, M.G., Salomón, O.D., Filho, J.D.A., Rosa, J.R., Parras, M.A., 2016. Argentinian phlebotomine fauna, new records of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) for the country and the province of Chaco. *Zootaxa* 4139, 427. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4139.3.8>

- Telleria, J., Bosseno, M.F., Tarifa, T., Buitrago, R., Martinez, E., Torrez, M., Le Pont, F., Brenière, S.F., 1999. Putative reservoirs of *Leishmania amazonensis* in a sub-andean focus of Bolivia identified by kDNA-polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 5–6. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000100002>
- Terayama, Y., Kato, H., Gomez, E. a, Uezato, H., Calvopiña, M., Iwata, H., Hashiguchi, Y., 2008. Molecular typing of sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from areas endemic for Leishmaniasis in Ecuador by PCR-RFLP of 18S ribosomal RNA gene. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 907–913. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.907>
- Thies, S.F., Ribeiro, A.L.M., Michalsky, É.M., Miyazaki, R.D., Fortes-dias, C.L., Fernandes Fontes, C.J., Dias, E.S., 2013. Phlebotomine sandfly fauna and natural *Leishmania* infection rates in a rural area of Cerrado (tropical savannah) in Nova Mutum, State of Mato Grosso in Brazil. *Rev. da Soc. Bras. Med. Trop. Trop.* 46, 293–298.
- Thomaz-Soccol, V., Gonçalves, A.L., Piechnik, C.A., Baggio, R.A., Boeger, W.A., Buchman, T.L., Michaliszyn, M.S., Rodrigues dos Santos, D., Celestino, A., Aquino, J., Leandro, A. de S., Paz, O.L. de S. da, Limont, M., Bisetto, A., Shaw, J.J., Yadon, Z.E., Salomon, O.D., 2018. Hidden danger: Unexpected scenario in the vector-parasite dynamics of leishmaniasis in the Brazil side of triple border (Argentina, Brazil and Paraguay). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006336>
- Turbeville, J.M., Pfeifer, D.M., Field, K.G., Raff, R.A., 1991. The Phylogenetic Status of Arthropods, as Inferred from 18S rRNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 8, 669–686.
- Vexenat, J.A., Barretto, A.C., Cuba, C.C., Marsden, P.D., 1986. Características Epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana em uma Região Endêmica do Estado da Bahia. III. Fauna Flebotomínica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 81, 293–301.
- Vivero, R.J., Bejarano, E.E., Estrada, L.G., Flórez, F., Ortega-Gómez, E., Aparicio, Y., Torres-Gutiérrez, C., Uribe-Soto, S., Muskus-López, C., 2017. DNA barcode for identification of immature stages of sand flies (Diptera: Psychodidae) collected from natural breeding sites. *Zootaxa* 4277, 228–236. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4277.2.3>
- Walton, B.C., Person, D.A., Bernstein, R., 1968. Leishmaniasis in the U.S. military in the Canal Zone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 17, 19–24.
- Wasserberg, G., Abramsky, Z., Kotler, B., Ostfeld, R., Yarom, I., Warburg, A., 2003. Anthropogenic Disturbances Enhance Occurrence of Cutaneous Leishmaniasis in Israel Deserts: Patterns and Mechanisms. *Ecol. Appl.* 26, 868–881.
- Watson, M., 1921. The prevention of malaria in the Federated Malay States, Second Ed. ed. LONDON. JOHN MURRAY, ALBEMARLE STREET, LONDON, W.
- WHO, 2014. A global brief on vector-borne diseases, World Health Organization. <https://doi.org/WHO/DCO/WHO/2014.1>
- WHO, 2010. Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva., World Health Organization technical report series. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1766>
- Yadon, Z.E., Rodrigues, L.C., Davies, C.R., Quigley, M.A., 2003. Indoor and peridomestic transmission of American Cutaneous Leishmaniasis in Northwestern Argentina: A retrospective case-control study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 519–526.
- 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), *Memories of the American Entomologic Institute.* <https://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>