

ISSN 0120-4157

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

PUBLICACIÓN ANTICIPADA EN LINEA

El Comité Editorial de *Biomédica* ya aprobó para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares académicos que lo evaluaron. Se publica anticipadamente en versión pdf en forma provisional con base en la última versión electrónica del manuscrito pero sin que aún haya sido diagramado ni se le haya hecho la corrección de estilo.

Siéntase libre de descargar, usar, distribuir y citar esta versión preliminar tal y como lo indicamos pero, por favor, recuerde que la versión impresa final y en formato pdf pueden ser diferentes.

Citación provisional:

Rueda-Concha KL, Payares-Mercado A, Guerra-Castillo J, Melendrez J, Arroyo-Munive Y, Martínez-Abad L, et al. Circulación silenciosa de *Leishmania infantum* y *Trypanosoma cruzi* en perros domésticos de áreas urbanas de Sincelejo, región Caribe de Colombia. *Biomédica*. 2022;42 (3).

Recibido: 19-11-21

Aceptado: 08-10-22

Publicación en línea: 29-10-22

**Circulación silenciosa de *Leishmania infantum* y *Trypanosoma cruzi* en
perros domésticos de áreas urbanas de Sincelejo, región Caribe de
Colombia**

Tripanosomátidos en perros urbanos del Caribe colombiano

**Silent circulation of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* among
urban dogs from Sincelejo city, Caribbean region of Colombia.**

Karol Liseth Rueda-Concha¹, Ana Payares-Mercado¹, Jesús Guerra-Castillo¹,
Jesús Melendrez¹, Yasmit Arroyo-Munive², Lily Martínez-Abad¹, Suljey Cochero¹,
Eduar Elías Bejarano¹, Luis Enrique Paternina¹

¹ Grupo Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia

² Clínica Veterinaria Mascotas, Sincelejo, Colombia

Correspondencia:

Luis E. Paternina, carrera 14 No. 16B-32, Barrio La Pajuela, Sincelejo, Sucre.

Teléfono: +57 (5) 2820830

lepaterninat@gmail.com

Contribución de los autores:

Karol Liseth Rueda-Concha: ensayos moleculares de detección, RFLP y secuenciación de ADN, análisis de datos y redacción del manuscrito.

Ana Payares-Mercado, Jesús Guerra-Castillo y Jesús Melendrez: recolección de muestras, extracción de ADN y tamizaje molecular inicial de los agentes infecciosos.

Yasmit Arroyo-Munive: recolección de muestras, valoración clínica de caninos y manejo/tratamiento de los casos animales.

Lily Martínez-Abad y Suljei Cochero: logística en campo y laboratorio, y redacción del manuscrito.

Eduar Elías Bejarano: apoyo logístico, supervisión en laboratorio, financiación del proyecto y redacción del manuscrito.

Luis Enrique Paternina: diseño del estudio y de las estrategias moleculares implementadas- Estandarizó y supervisó los ensayos moleculares, análisis genéticos y redacción del manuscrito.

Introducción: La enfermedad de Chagas y la leishmaniasis tradicionalmente se han considerado zoonosis endémicas de áreas rurales del país, sin embargo, la aparición de casos de estas enfermedades en áreas urbanas sugiere nuevos ciclos de circulación de estos parásitos. Por ello, se ha propuesto a los perros como centinelas de estos agentes zoonóticos dado su rol de hospederos accidentales o reservorios.

Objetivo: evaluar la circulación silenciosa de *Leishmania* y *T. cruzi* en perros residentes de zonas urbanas de la ciudad de Sincelejo, Sucre.

Materiales y métodos: 100 muestras de sangre de caninos se emplearon para amplificar la región ITS1 de *Leishmania*, las muestras positivas fueron utilizadas para amplificar la región conservada del minicírculo del ADN del kinetoplasto de *L. infantum* y para el análisis de restricción con la endonucleasa HaeIII. Por otra parte, se amplificó un fragmento del DNA satelital de *T. cruzi*. Adicionalmente, se evaluó la presencia de *E. canis* y *A. platys* como infecciones potencialmente modificadoras de los cuadros clínicos.

Resultados: *Leishmania* fue detectada en 32% (32/100) y *T. cruzi* en 12%(12/100) de los perros estudiados. El 7% (7/100) de los perros fueron positivos a ambos parásitos. Se detectó *L. infantum* en 18% (18/100) de los perros. Infecciones por anaplasmatáceos fueron detectadas en 18% (18/100) de los perros, se encontró coinfecciones por bacterias y parásitos en 8% (8/100) de los perros. En general, 47% (47/100) de los animales fueron infectados por al menos un agente etiológico.

Conclusión: se demuestra la circulación de *L. infantum* y *T. cruzi* en zonas urbanas de Sincelejo, así como coinfecciones de estos parásitos con anaplasmatáceos. El presente estudio demuestra la conveniencia del uso de caninos en la vigilancia de estos agentes zoonóticos.

Palabras clave: *Leishmania infantum*; *Trypanosoma cruzi*; zoonosis, urbanización, Colombia.

Introduction: *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* are considered endemic zoonotic agents from rural areas of the country, however, there is a high risk of urbanization due to anthropogenic processes. For this reason, dogs have been proposed as sentinels of these zoonoses given their role as patients, hosts and/or reservoirs.

Objective: to assess the silent circulation of *Leishmania* and *T. cruzi* parasites in canines from urban areas of Sincelejo, Sucre.

Materials and methods: 100 canine blood samples were used to amplify the ITS1 region of *Leishmania* spp. positive samples were used to amplify the conserved region of the kinetoplast DNA minicircle of *L. infantum* and for restriction analysis with HaeIII endonuclease. In addition, a fragment of the satellite DNA of *T. cruzi* was amplified. In addition, the presence of *E. canis* and *A. platys* was evaluated as infections that can influence the clinical symptoms and health of animals.

Results: *Leishmania* was detected in 32% (31/100) and *T. cruzi* in 12% (12/100) of the animals, 7% (7/100) of the samples were positive for both parasites and *L. infantum* was detected in 18% (18/100). Anaplasmatocae infections were detected in 18% (18%) of the animals, co-infections by bacteria and parasites were found in 8% (8/100) of the animals. Overall, 47% (47/100) of the animals were infected by at least one agent.

Conclusion: the circulation of *L. infantum* and *T. cruzi* is demonstrated in urban areas of Sincelejo, as well as co-infections of parasites with anaplasmatocae. The

present study demonstrates the convenience of the use of canines in the surveillance of these zoonotic agents.

Keywords: *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cruzi*, zoonoses, urbanization, Colombia.

Las enfermedades zoonóticas representan un gran porcentaje de todas las enfermedades infecciosas recientemente identificadas, así como de muchas de las ya existentes. Se estima que aproximadamente el 61% de todos los patógenos humanos conocidos son zoonóticos, representando cerca del 75% de todos los patógenos emergentes durante la última década y constituyendo un problema serio en salud pública humana y veterinaria (1).

Dentro de estas zoonosis se encuentran la leishmaniasis y la tripanosomiasis americana (conocida también como enfermedad de Chagas), ambas enfermedades transmitidas por vectores y causadas por protozoarios parásitos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae (2). Estas parasitosis se consideran problemas graves de salud pública porque representan un riesgo potencialmente mortal si no se diagnostican y tratan a tiempo (3,4).

La enfermedad de Chagas es causada por la infección con el parásito *T. cruzi*, que afecta entre 6 a 7 millones de personas principalmente en Latinoamérica, incluyendo a Colombia (3,5). Entre 2008 hasta 2019 se han registrado 21 brotes por transmisión oral en los departamentos de Santander, Casanare, Cesar, Meta, Bolívar, Antioquia y, últimamente, en nuevos escenarios como Chocó, Atlántico y Sucre (6). Los brotes de enfermedad de Chagas ocurridos por transmisión oral han aumentado la tasa de letalidad a 7,9 %, valor que está por encima de otras ETV de relevancia en el país como fiebre por dengue y malaria (7).

Por otra parte, la leishmaniasis es causada por varias especies del género *Leishmania* que pueden provocar cuadros cutáneos (leishmaniasis cutánea, LC), mucosos (leishmaniasis mucosa, LM) o cuadros viscerales (leishmaniasis visceral, LV), que, desafortunadamente, suelen presentarse en niños de zonas donde la enfermedad es endémica. Esta última forma clínica (LV) suele ser letal si no se trata a tiempo y es causada específicamente por el parásito *L. infantum* (8).

En Colombia, al final del año 2019 se registraron en conjunto, para las dos enfermedades, 5199 casos (237 casos de enfermedad de Chagas y 4.962 casos de leishmaniasis), 555 de estos casos fueron registrados para los departamentos de la región Caribe de Colombia, la enfermedad de Chagas fue reportada en Atlántico, Cesar y el departamento de Sucre, y la leishmaniasis en Bolívar, Córdoba, Guajira, Magdalena, Santa Marta, Sucre, Atlántico, Barranquilla, Cartagena y Cesar (6). En términos cuantitativos, se puede considerar una contribución moderada (10.67% del total de casos reportados), sin embargo, es necesario mencionar que casi la totalidad de los casos de LV (cuadro altamente letal) en el país, se presentan en el núcleo de los departamentos de Córdoba, Sucre y Bolívar (9). Estos dos últimos componen el foco mixto de Leishmaniasis de los Montes de María.

Tanto la enfermedad de Chagas y como la leishmaniasis se han considerado zoonosis endémicas de áreas rurales del país; sin embargo, desde hace algunos años, se han reportado numerosos hallazgos de parásitos en insectos vectores (flebotomíneos como: *Lutzomyia evansi*, *L. panamensis* y *L. gomezi*, y *triatominos*

como: *Panstrongylus geniculatus*), infección en animales sinantrópicos (*Mus musculus* y *Rattus rattus*) y/o algunos casos de enfermedad en zonas urbanas, principalmente en zonas de la región Caribe (Sincelejo, Ovejas y Cartagena) (10-17), (Romero-Ricardo LR, Martínez L, Pérez-Doria A, Bejarano EE. Infección natural de *Panstrongylus geniculatus* con *Trypanosoma cruzi* en el área urbana de Sincelejo, Sucre. XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. 2015-10-20), evidencias que señalan la circulación de ambos parásitos tripanosomatídeos en zonas urbanas de la región Caribe de Colombia.

En el estudio de ambas enfermedades en Latinoamérica, los perros han sido utilizados exitosamente para revelar la circulación de *T. cruzi* y *Leishmania spp.* en áreas endémicas que son principalmente rurales. Esto se debe a que los perros son considerados hospederos importantes de *T. cruzi* en países como Argentina, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Colombia, entre otros; han sido incriminados como el principal reservorio de *L. infantum*, el agente causal de LV en América y han sido encontrados infectados con otras especies de este mismo género (2,13,14,18-21).

Debido al papel que pueden desempeñar los caninos, ya sea como reservorio, hospederos accidentales o como centinelas de la transmisión de estos agentes zoonóticos, por su cercanía con las poblaciones humanas, así como su constante exposición a vectores tanto de *T. cruzi* como de *Leishmania spp.* (triatominos y flebotomíneos, respectivamente), la vigilancia epidemiológica de estos animales se puede considerar como una herramienta fundamental para obtener información

relevante sobre potenciales eventos de urbanización y prever incluso la ocurrencia de brotes de estas enfermedades (2,18-20). Dados los antecedentes de ambos parásitos en zonas periurbanas (21) y urbana (Romero-Ricardo LR, Martínez L, Pérez-Doria A, Bejarano EE. Infección natural de *Panstrongylus geniculatus* con *Trypanosoma cruzi* en el área urbana de Sincelejo, Sucre. XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. 2015-10-20) de la ciudad de Sincelejo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la potencial circulación de estos parásitos tripanosomatídeos en caninos residentes de zonas urbanas de la capital del departamento de Sucre.

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se realizó en área urbana del municipio de Sincelejo, ciudad capital del departamento de Sucre, el cual pertenece a la subregión de los Montes de María y se encuentra ubicado a 213 m sobre el nivel del mar, a una latitud: 9°18'16"N y longitud 75°23'52"O. El clima de la ciudad es tropical seco (Aw), presentando temperatura media anual ~26.6 °C y precipitación anual de 1164 mm. El área urbana congrega a aproximadamente 269 mil habitantes (>90% de la población total del municipio) y el 24.9% de esta población la constituyen menores entre los 0 a 14 años de edad (22).

Tipo de estudio y muestra caninas

El tipo de estudio fue exploratorio, todos los perros que participaron asisten regularmente a las clínicas veterinarias para ser atendidos por diferentes motivos

(peluquería, guardería, spa, consultoría clínica, entre otros), tienen plan sanitario activo (vacunación y desparasitación) y se consideran residentes de la zona urbana de la ciudad, el personal de la clínica realizó la valoración del estado de salud cada animal y el registro datos básicos de los mismos como edad, sexo, raza (nomenclatura American Kennel Club) y barrio de residencia.

Registro de datos y toma de muestra de sangre periférica

En las instalaciones de una clínica veterinaria se realizó valoración del estado de salud cada animal involucrado en el estudio y se procedió al registro de datos como: edad, sexo, raza (nomenclatura American Kennel Club) y dirección de residencia. Posteriormente, 2mL de sangre periférica fueron extraídos por punción de la vena cefálica; las muestras fueron depositadas en microtubos de polipropileno (Axygen, USA) con EDTA o tubos Vacutainer DB EDTA-k3 (Fisher Scientific, Madrid). Cada muestra fue rotulada con un código alfanumérico que corresponde con datos básicos de cada animal incluido en el estudio. Las muestras de sangre total fueron almacenadas a 4°C hasta su procesamiento molecular.

Extracción de ADN genómico y evaluación de integridad

La extracción de ADN genómico a partir de la muestra de sangre periférica fue realizada de acuerdo a un protocolo de altas concentraciones salinas y Cloroformo:Alcohol-Isoamílico (23). El ADN extraído fue resuspendido en 30µL de agua ultrapura hasta su uso en ensayos moleculares.

La evaluación de integridad de todos los extractos de ADN se realizó mediante una PCR convencional con los cebadores UNFOR403 (5-TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GG-3) y UNREV1025 (5-GGT TGT CCT CCA ATT CAT GTT A-3) que permite amplificar una región de aproximadamente 623 pares de bases (pb) del gen mitocondrial Citocromo b de mamíferos (24).

Detección de ADN de Leishmania spp. mediante PCR de ITS1 ribosomal

Para la detección de ADN de *Leishmania* spp. se intentó la amplificación de la región nuclear ITS1 ribosomal, empleando los cebadores LITSR (5-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3) y L5.8S (5-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT-3) que amplifican un fragmento entre 300-350 pb, dependiendo del complejo de *Leishmania* al que pertenece cada especie detectada: 300 pb para especies del subgénero *L. (Viannia)*, 317-320 pb para especies del complejo *L. donovani* como *L. infantum*, y 330-350 pb para especies del complejo *L. mexicana* (25). La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 10µL, compuesto por Buffer Mix 5X, Buffer Q Plus 1X, 0.5µM de cada cebador, 1U de Taq ADN Polimerasa (ExAct TM Plus), y 3µL de ADN problema, la amplificación fue optimizada con respecto a la temperatura indicada por los Tm de los cebadores y se realizó bajo las siguientes condiciones de ciclado: 3 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguida por 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, alineamiento de cebadores a 53°C durante 30 segundos y extensión de cadena a 72°C durante 45 segundos y una extensión final a 72°C durante 5 minutos, el material amplificado se mantuvo a 4°C hasta el análisis en geles de agarosa (26).

Detección específica del kADN de Leishmania infantum

La detección específica de ADN de *L. infantum* en las muestras que presentaron el amplificado correspondiente al ITS1 ribosomal de *Leishmania* spp. se realizó mediante una segunda PCR, utilizando los iniciadores FLC2 (5'-GTC AGT GTC GGA AAC TAA TCC GC-3') y RLC2 (5'-GGG AAA TTG GCC TCC CTG AG-3'), que flanquean un segmento de 230pb de la región conservada del minicirculo del ADN del kinetoplasto de *L. infantum*. La mezcla de la reacción contenía Buffer 1X, 0.5µM de cada cebador, 0.6mM de los dNTP's, 1.5mM de MgSO₄, 1.5U de Taq ADN polimerasa (Applied Biological Materials Inc., Canada), y 3µL de ADN problema, en un volumen final de 10µL. Las condiciones de ciclado fueron optimizada con respecto a la temperatura indicada por los cebadores y bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 58°C y un minuto a 72°C. Después de 10 min a 72°C, el material amplificado se mantuvo a 4°C hasta el análisis en geles de agarosa (27).

Identificación de Leishmania mediante RFLP y secuenciación de ADN

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos por las estrategias basadas en la amplificación de fragmentos de genes específicos, los productos de PCR de ITS1 de *Leishmania* fueron sometidas análisis de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) con la endonucleasa HaeIII para determinar si los parásitos detectados pertenecían a *L. infantum*, complejo *L. mexicana* o a especies del

subgénero *L. (Viannia)* (28-32), siguiendo las condiciones y recomendaciones de Céspedes-Chaves y coautores (33).

Algunos productos de interés de la ITS1-PCR fueron seleccionados para ser enviados a secuenciación (Macrogen®; Seúl, Corea del Sur). Las secuencias consenso, obtenidas por ensamblaje de los electroferogramas de secuenciación editados, fueron comparadas con secuencias depositadas en las bases de datos GenBank® mediante BLASTn con el algoritmo MegaBLAST. La identificación de especies fue confirmada mediante dendrogramas de secuencias utilizando el software MEGA X® (34).

Detección específica de ADN de Trypanosoma cruzi

La detección de ADN de *T. cruzi* se realizó mediante dos PCR distintas. Primero se pretendió la amplificación de un fragmento de 166pb del ADN satelital del parásito, utilizando los cebadores Cruzi 1 (5'-AST CGG CTG ATC GTT TCG A-3') y Cruzi 2 (5'-AAT TCC TCC AAG CAG CGG ATA-3'); las reacciones de amplificación se realizaron en volúmenes de 10µL, que contenía: buffer de PCR 1X, 1.5mM de MgSO₄, 0.5µM de cada cebador, 1.5U de Taq ADN Polimerasa (Applied Biological Materials Inc., Canada), 0.6µL de dNTP y 3µL de ADN problema; fue utilizado un termociclador Veriti (Applied Biosystems™, USA), con el siguiente perfil térmico: 3 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto y por último, una extensión final a 72°C durante 5 minutos (35).

Posteriormente, se realizó una segunda PCR para confirmar los hallazgos en la

reacción anterior. En esta reacción se pretendió la amplificación de un fragmento de 330pb del minicírculo del kADN de *T. cruzi* con los cebadores 121 (5- AAA TAA TGT ACG GKG GAG ATG CAT GA-3) y 122 (5- GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3); las reacciones se realizaron en volúmenes de 10µL con la siguiente composición: buffer de PCR 1X, 1.5mM de MgSO₄, 0.5µM de cada cebador, 1.5U de Taq ADN Polimerasa (Applied Biological Materials Inc., Canada), 0.6uL de dNTP y 3µL de ADN problema. El perfil térmico empleado fue el siguiente: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 segundos, 64°C por 1 minuto, a 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 5 minutos, se empleó el termociclador Applied Biosystems™ Veriti (36,37). La utilización de ambos tipos de dianas nucleares (ADN satélite) y kinetoplásticas se considera apropiada para el diagnóstico de este parásito en sangre e insectos vectores. Una muestra fue considerada positiva a la infección cuando se obtuvo la amplificación de ambas dianas (38,39).

Detección de Anaplasmatáceos Transmitidos por garrapatas (ATG)

Debido a la alta incidencia de agentes anaplasmatáceos en perros del país, *Anaplasma platys* y *Ehrlichia canis*, y la influencia que pueden ejercer sobre la severidad de los síntomas que suelen relacionarse con la leishmaniasis canina (40-42), se decidió incluir el tamizaje de ambos agentes en los perros analizados. Primero, se realizó la detección específica de *A. platys* empleando los cebadores Apl-Hs475F (5-AAG GCG AAA GAA GCA GTC TTA-3) y Apl-Hs1198R (5-CAT AGT CTG AAG TGG AGG AC-3) que amplifican una región de 723pb del gen

groESL (43-45). Por otra parte, la detección de *E. Canis* fue realizada con los cebadores Ehr-groESLF (5-CAA TAG CAA GAG CCA ATG-3) y Ehr-groESLR (5-TTA GAA GAT GCT GTA GGA TG-3) que amplifican una región ~145pb del operon groESL de éste género bacteriano (46). Adicionalmente, se realizó otra PCR para detectar ADN de *E. canis*, empleando cebadores desarrollados para el presente trabajo denominados: Ecaj_0423F (5-TCC TGT TGA TGG ACA AAG TGT T-3) y Ecaj_0423R (5-ACC TGT AGC ACC ACA TTC TTG-3), que amplifican un fragmento de 403pb del gen putativo Ecaj_0423 descrito por Mavromatis y coautores (2006) en el análisis de genoma de *E. canis* cepa Jake.

La diana seleccionada (Ecaj_0423, CDS de 744 nucleótidos) está presente tanto en la cepa Jake de Estados Unidos de América (CP000107) como en la cepa YZ-1 de China (CP025749), y, de acuerdo a los análisis de similitud local contra todas las secuencias depositadas en Genbank (base de datos "nr"), es una región exclusiva de *E. canis*. Los cebadores diseñados fueron evaluados extensivamente en las plataformas InSilico (Universidad del País Vasco) y Primer-BLAST (NCBI) con el fragmento deseado exclusivamente en *E. canis*.

Análisis de datos y aspectos éticos

Los datos de los animales (sexo, raza, edad, y comuna de procedencia) fueron contrastadas con la infección por los dos parásitos kinetoplástidos mediante pruebas de múltiples proporciones de Fisher o de asociación de Chi-cuadrada en el programa R V. 4.1.1 (47). Además, utilizando el programa QGIS V. 3.4® (48), se realizó un mapeo de la positividad a *Leishmania*, *T. cruzi* y ATG de acuerdo con

los barrios de procedencia de los animales afectados, con el fin de ilustrar la distribución geográfica de los parásitos y bacterias.

La toma de muestras solo fue realizada con la expresa autorización y firma de consentimiento informado por parte del propietario de cada animal, documentos que reposan en la Clínica para evitar conflictos éticos por manejo de datos en la relación Médico-Cliente-Paciente en la práctica veterinaria (49). Informes de los resultados moleculares fueron remitidos a los médicos veterinarios para concertar el manejo y tratamiento de los animales con los propietarios, aplicar medidas de protección contra vectores (collares impregnados con deltametrina y formulaciones insecticidas/repelentes de uso tópico) y realizar seguimiento clínico de los mismos, lineamientos que han sido ampliamente recomendado por expertos en del área (44,50). Todos los procedimientos de toma de muestras, manejo de animales y tratamiento de los datos fueron avalados por el Comité Institucional de Bioética de la Universidad de Sucre (Sesión Ordinaria #4, 12 octubre de 2017).

Resultados

Características de la muestra canina analizada

En el presente estudio fueron incluidos 100 perros domésticos del sitio de estudio. Se distribuyeron en 21 razas (los animales mestizos fueron tratados como una raza para conveniencia del análisis categórico), representadas por mestizos (19%, 19/100), seguido de French Poodle (15%, 15/100) y Pinscher Miniatura (13%, 13/100). Las edades tuvieron un rango de los 3 a 168 meses.

Con respecto al grupo etario, el 70% (70/100) fueron considerados adultos (animales con edades entre 13-84 meses), 18% (18/100) seniles (> 84 meses) y 12% (12/100) cachorros (animales con edades entre 0-12 meses) (cuadro 1). Mediante el examen clínico se encontró que el 78% de los caninos estudiados fueron asintomáticos y el 22% restante presentó al menos un signo clínico (oligosintomático) compatible o relacionable con tripanosomiasis canina y/o leishmaniasis canina. En total se registraron hasta 13 signos clínicos en los 22 animales sintomáticos (sólo la comuna 6 no presentó sintomáticos) con la siguiente frecuencia: vómito severo (4 animales), diarrea (3 animales), fiebre (3 animales), sangrado nasal (2 animales), sospecha hemoparásitos (2 animales), anemia (1 animal), dermatitis (1 animal), dermopatía severa (1 animal), fallo renal (1 animal), inapetencia (1 animal), infección urinaria (1 animal), queratoconjuntivitis seca (1 animal) y úlcera corneal (1 animal). En relación con la distribución de los caninos en la ciudad, toda la población analizada pertenecía a la zona urbana de Sincelejo y pudo representarse a 8 de las 9 comunas existentes dentro del municipio (comuna 1 sin datos), el mayor número de animales muestreados pertenecía a la comuna 7 seguido de la comuna 3 y 4 (cuadro 1).

Frecuencia de infección por Leishmania spp.

La frecuencia de infección por *Leishmania* spp. mediante la detección de la región ITS1 ribosomal en la población de perros estudiados fue del 32% (32/100) (figura 1). De ellos, 16 fueron hembras y 16 machos, con edades que oscilaban entre los 7 a 168 meses (78.2% de los 32 fueron adultos). La mayor parte de los perros

infectados por estos parásitos fueron mestizos con 9%, seguido por French Poodle con 4% y por Schnauzer con 4% (cuadro 1). En relación con los signos clínicos 7 (21.87%) animales presentaban al menos un signo clínico relevante: 3 de ellos con vómito severo (3/4), uno con úlcera corneal, uno con dermatopatía, uno con infección urinaria y uno con cuadro febril (1/3).

Tipificación de Leishmania spp. en los caninos infectados

A partir de las 32 muestras positivas a la ITS1 de *Leishmania*, fue posible detectar específicamente ADN de los minicírculos del kinetoplasto de *L. infantum* en el 40.6% (13 animales) de los caninos positivos a ITS1 (figura 1). Uno de estos animales positivos, murió con un cuadro severo de dermatopatía, semanas después de la toma de muestra en el centro veterinario.

Mediante la RFLP, se logró determinar la presencia del perfil de restricción típico de *L. infantum* en 11 de las 32 muestras evaluadas (figura 1). Además, se lograron visualizar perfiles mixtos que no permitieron la identificación inequívoca de otras especies. Por otro lado, los análisis bioinformáticos de 5 secuencias provenientes de muestras previamente identificadas como *L. infantum* (todas identificadas por RFLP y 4 de ellas positivas a kADN de *L. infantum*), permitieron confirmar estos resultados con alta confianza de agrupación (Bootstrap 99) al ser contrastadas con secuencias de referencia de distintas especies de este género (figura 2).

Todas las secuencias presentaron una similitud >95%-100% con secuencias de *L. infantum* reportadas en Genbank (códigos MN503527-MN496380).

7 de los 18 caninos infectados con *L. infantum*, presentaba algún síntoma mencionado anteriormente y 11 animales fueron completamente asintomáticos.

Frecuencia de infección por T. cruzi

En cuanto a la frecuencia de infección por *T. cruzi*, se pudo determinar que el 12% de las 100 muestras evaluadas fueron positivas en los ensayos realizados empleando los dos juegos de cebadores dirigidos contra esta especie (figura 3). De estos, 5 fueron hembras y 7 machos, con edades que van de los 7 hasta los 144 meses. La mayor frecuencia de infección con *T. cruzi* se obtuvo en perros adultos (9%, 9/100). Además, 8 de las 21 razas representadas en el tamaño de muestra tuvieron al menos un individuo infectado, siendo los mestizos y los Pinchers los más afectados por estos parásitos (3% 3/100). Cabe resaltar que 4 de los perros positivos presentaron síntomas: uno de ellos con vómito severo, uno con infección urinaria, uno con úlcera corneal y uno con fiebre.

Adicionalmente, se encontraron 7 caninos co-infectados con parásitos del género *Leishmania*, 4 de ellos co-infectados específicamente con *L. infantum* y *T. cruzi* y, en 2 de ellos, se encontraron signos clínicos como f úlcera corneal y otro con infección urinaria.

Frecuencia de infección por Anaplasmatáceos

En relación a la infección por ATG, 18 animales fueron positivos a *E. canis* y uno de ellos presentó co-infección con *A. platys* (figura 3). De los animales positivos, 5 presentaron síntomas: 2 con fiebre, uno con vómito severo, uno con falla renal y uno con infección urinaria.

En este tamizaje 10 animales fueron exclusivamente positivos a ATG, 3 co-infectados por *Leishmania*-ATG (todos infectados por *L. infantum*, y uno de ellos con co-infección *A. platys* y *E. canis*), 3 co-infectados por *T. cruzi*-ATG (todos *E. canis*), y finalmente 2 animales con infección múltiple por ATG (*E. canis*), *T. cruzi* y *L. infantum*. En general 47 animales fueron positivos a al menos uno de los agentes evaluados, y entre todos ellos se pueden listar el 50% de los animales sintomáticos (11/22).

Distribución de animales infectados y análisis de variables

Animales infectados con cualquiera de los 4 agentes analizados (*Leishmania*, *T. cruzi*, *E. canis* y/o *A. platys*) fueron encontrados en todas las comunas analizadas.

Las comunas 4 y 7 presentaron la mayor cantidad de animales infectados (13 cada uno), mientras sólo un positivo fue hallado en las comunas 6, 8 y 9.

En cuanto a parásitos, animales positivos a *L. infantum* se encontraron en todas las comunas analizadas a excepción de la Comuna 6: 3 animales en Comuna 2, 2 en Comuna 3, 3 en Comuna 4, 2 en Comuna 5, 6 en Comuna 7, 1 en Comuna 8, 1 en Comuna 9. En cuanto a *T. cruzi*, éste fue hallado en 4 de las 7 comunas de la siguiente forma: uno en la Comuna 2, 4 en Comuna 3, 3 en Comuna 4, y 4 en Comuna 7. Todos los resultados antes mencionados son ilustrados espacialmente de acuerdo a las divisiones por comunas de la ciudad de Sincelejo (figura 4).

Al contrastar la positividad (resultados positivos a la PCR) a parásitos del género *Leishmania* y *T. cruzi* con las características de la población estudiada de perros

como edad (como grupos etarios), sexo, raza y comuna de residencia, no se encontró asociación estadísticamente significativa.

Discusión

La distribución de casos de leishmaniasis y tripanosomiasis americana en humanos y animales domésticos ha cambiado con el desarrollo urbanístico de los asentamientos humanos, así como por factores sociales e industriales a escala global (51). Los ciclos de transmisión de estas enfermedades se consideran influenciados por actividades humanas como la migración de personas desde áreas rurales hacia áreas urbanas y otros fenómenos como la creciente deforestación y el cambio climático, que pueden inducir a su vez cambios en la ecología de vectores y reservorios de los microorganismos patógenos (52).

Anteriormente, la importancia del perro doméstico en el ciclo de transmisión de *T. cruzi* y *L. infantum* en Colombia estuvo restringida al ámbito rural (53,54); sin embargo, desde hace algunos años se sugiere que estos animales podrían estar implicados en procesos de urbanización de estos parásitos, por tanto, la vigilancia epidemiológica de los perros (como centinelas) en estas áreas se considera fundamental para comprender su participación en éstas “nuevas dinámicas” de transmisión (2,55).

La circulación de parásitos del género *Leishmania* en Sincelejo está íntimamente relacionada con la cercanía a zonas endémicas principalmente los Montes de María que constituye uno de los focos mixtos de leishmaniasis más importante de Colombia, la facilidad de movilización de la población humana y animales desde o

hacia zonas rurales donde la enfermedad es endémica, lo que puede permitir el desplazamiento de animales infectados, sumado a la presencia y alta abundancia de los vectores en esta zona del país, favorece que se mantenga el ciclo de transmisión de estos parásitos en áreas urbanas (10,56,57); todos se consideran factores que predisponen a estos centros urbanos a la circulación de agentes zoonóticos como *L. infantum*, capaces de afectar a una gran parte de la población infantil de la ciudad dado su amplia distribución al interior de la zona urbana, y por supuesto por la presencia del vector local (58). Estos hallazgos prenden alarmas sobre la potencial aparición de casos autóctonos de LV, aunque es necesario aclarar que aún no existen datos sobre infección por *Leishmania* en vectores de la ciudad.

La frecuencia de infección por *Leishmania* en perros en zonas urbanas de Sincelejo (32%, 32/100) es tan alta como la reportada en zona rural de este municipio por Paternina y colaboradores hace 8 años, quienes encontraron que el 34.9% (29/83) de los perros de Sabanas del Potrero (zona rural y periurbana de Sincelejo) estaban infectados por parásitos del género *Leishmania* lo que sugiere la potencial y eventual aparición de ciclos de transmisión urbanos y que los caninos probablemente están participando como reservorio u hospedero de estos parásitos (21); además, la frecuencia de infección es cercana a la reportada en perros de zonas urbanas del municipio de Ovejas (departamento de Sucre) 44% (52/118), y aunque esta frecuencia es mayor a la observada en nuestro trabajo, vale la pena señalar que este municipio, a diferencia de Sincelejo, reporta

periódicamente casos urbanos de leishmaniasis humana y pertenece al área que se considera endémica en Los Montes de María (59). Las altas frecuencias de infección en perros de zonas urbanas de Sincelejo podrían sugerir su papel como reservorio de parásitos; sin embargo, los xenodiagnósticos sobre caninos indican que los animales asintomáticos u oligosintomáticos no son fuentes de parásitos tan eficientes para *Lutzomyia evansi* (vector local), en comparación con los experimentos realizados sobre animales polisintomáticos (60,61).

En cuanto al diagnóstico de las 18 muestras identificadas como *L. infantum* (utilizando combinación de RFLP, PCR de kADN y/o secuenciación de ADN), 4 de éstas fueron identificadas por los 3 mecanismos usados en la tipificación de *Leishmania*. Con esto se confirma la circulación de este parásito en el área urbana de Sincelejo, aportando evidencias de la urbanización de estos parásitos en diversas zonas de la ciudad. La presencia de esta especie parasitaria en Sincelejo se suma a reportes de otras áreas urbanas del Caribe colombiano, primero en Cartagena (Región Caribe), a partir de un perro diagnosticado serológicamente con este mismo parásito (17) y luego en el área urbana del municipio de Ovejas (Región Caribe), a partir de cultivo de ganglio poplíteo e isoenzimas (62), por otro lado, se suma también al reporte de un caso de leishmaniasis canina por *L. infantum* en área urbana de Cali (región Andina) confirmado por serología, RFLP y secuenciación de ADN (63).

En relación a la positividad a *T. cruzi*, curiosamente es superior a la reportada en Cumaral (Meta) donde se reportó positividad a este parásito en 1.6% de los

caninos (19). En contraste, se consideran similares a los reportados en zona urbana de 4 municipios de Santander con frecuencias de infección de 12.1% (64), y con lo reportado en área rural de Boyacá donde se encontró frecuencias de infección de 15% (65). En el caso de la circulación de este parásito en Sincelejo, la positividad de animales puede darse por transmisión vectorial debido a la presencia de triatominos infectados (Romero-Ricardo LR, Martínez L, Pérez-Doria A, Bejarano EE. Infección natural de *Panstrongylus geniculatus* con *Trypanosoma cruzi* en el área urbana de Sincelejo, Sucre. Vol. 35 (2015): Suplemento No. 4, XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. 2015-10-20), aunque no se descarta la vía transfusional y especialmente la Oral, ésta última responsable de un brote reciente de al menos 15 casos (3 casos fatales) en zona rural del municipio El Roble (departamento de Sucre) (6,66). Razón por la cual el hallazgo de estos parásitos en caninos de zonas urbanas puede considerarse muy preocupante.

En general, se determinó que 7 caninos estaban co-infectados por *Leishmania* y *T. cruzi*, 4 de ellos co-infectados específicamente por *L. infantum-T. cruzi*, siendo el primer estudio en reportar esta co-infección en caninos de un centro urbano del país. En Latinoamérica esta coinfección solo se ha reportado en caninos de zonas endémicas a ambas enfermedades en Venezuela (2) y Brasil (67,68). La interacción entre *Leishmania* y *Trypanosoma* en un mismo huésped pueden alterar la frecuencia u ocurrencia de la infección, la patogenicidad, tal como suele ser

evidente por la presentación de síntomas como la onicogriposis y lesiones cutáneas (67), además, la presencia de co-infecciones puede influir en el diagnóstico clínico y alterar la respuesta de los tratamientos, y potencialmente influir en la dinámica de transmisión a través de la infectividad de vectores como ha sido demostrado anteriormente (61,69).

El diagnóstico de ATG (en particular *E. canis*) se considera relevante ya que ha sido asociada previamente a Leishmaniasis Canina, y en nuestro caso, aunque es frecuente en perros, solo 3 de los 8 perros co-infectados por ATG y algún (ó ambos) tripanosomátidos fueron sintomáticos: uno con fiebre, uno con vómito severo, y uno con infección urinaria. De hecho, se puede inferir que las infecciones por ATG se podrían encontrar en fase crónica debido a la gran cantidad de asintomáticos (13, de 18 ATG positivos) e incidencia principalmente en adultos. La asociación de positividad a ATG y hembras es fácilmente explicable debido a la composición de la muestra en las Comunas 4, 5 y 7, que aportaron 34 hembras totales al análisis y aportaron 11 de las 14 hembras infectadas, explicando la tendencia de mayor cantidad de hembras infectadas.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se demuestra la circulación silenciosa de *L. infantum* y *T. cruzi* en perros domésticos de zonas urbanas de la ciudad de Sincelejo, independientemente de la infección por *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys*. No existió ninguna relación entre los ATG y tripanosomatídeos evaluados. Los hallazgos demuestran la utilidad de los caninos como centinelas

en el monitoreo de estas zoonosis y encienden alarmas sobre la eventual aparición de brotes de ambas enfermedades en centros urbanos del Caribe.

Agradecimientos

A todos los auxiliares de la Clínica Veterinaria Mascotas por su colaboración en el manejo y valoración general de los animales.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses en este trabajo.

Financiación

Karol Liseth Rueda-Concha agradece a la Universidad de Sucre por la financiación de sus estudios de maestría a través de la “Beca Posgradual”, y por la financiación parcial del trabajo mediante el programa de Estímulos Institucional a Grupos de Investigación. Luis Enrique Paternina agradece al Fondo Francisco José de Caldas de MinCiencias por su apoyo a través del programa de Estancias Postdoctorales Nacionales mediante el convenio 268-2018.

Referencias

1. **World Health Organization.** Zoonosis. Fecha de consulta: 1 de febrero de 2020. Disponible en: <https://www.who.int/zoonoses/en/>
2. **Vietri M, Herrera L, Aguilar CM, Morocoima A, Reyes J, Lares M, et al.** Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania* spp. coinfection in domestic, peridomestic and wild mammals of Venezuelan co-endemic areas. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2018;14:123-30. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.10.002>

3. **World Health Organization.** Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Fecha de consulta: 1 de agosto de 2020. Disponible en: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
4. **World Health Organization.** Leishmaniasis. Fecha de consulta: 1 de agosto de 2020. Disponible en: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
5. **Sanabria-Calvo M.** Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas. Revista Médica de Costa Rica y Centroamerica LXXI. 2015;616:539-44.
6. **Instituto Nacional de Salud.** Vigilancia intensificada de lesiones por Pólvora pirotécnica. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica 52. 2019. Fecha de consulta: 1 de agosto de 2020. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019_Boletin_epidemiologico_semana_52.pdf
7. **Instituto Nacional de Salud.** Enfermedad de Chagas: brotes de transmisión oral en Colombia. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica 33. 2019. Fecha de consulta: 1 de agosto de 2020. Disponible: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2033.pdf>

8. **Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al.** Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7:e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
9. **Instituto Nacional de Salud.** Leishmaniasis. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica 41. 2019. Fecha de consulta: 1 de agosto de 2020. Disponible en: https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2019_Boletin_epidemiologico_semana_41.pdf
10. **Bejarano E, Uribe S, Rojas W, Vélez ID.** Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:645-7. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000500010>
11. **Bejarano E, Uribe S, Rojas W, Velez ID.** Presence of *Lutzomyia evansi*, a vector of American visceral leishmaniasis, in an urban area of the Colombian Caribbean coast. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001;95:27-8. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(01\)90320-7](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(01)90320-7)
12. **Canchila L CM, Rueda K, Meza E, Rivero M, Pérez-Doria A, Rodríguez J, et al.** Prevalencia de anticuerpos frente a *Leishmania* spp. en roedores sinantrópicos de un foco mixto de leishmaniasis en el área urbana del municipio de Ovejas, Colombia. [tesis]. Sincelejo: División de Bibliotecas e información científica, Universidad de Sucre; 2015.

13. **Fernández J, Bello F, López M, Moncada L, Ayala M, Orejuela S, et al.** Determinación de Anticuerpos IgG contra *Leishmania chagasi* en caninos de la ciudad de Neiva (Huila, Colombia). Revista de Investigación. 2006;6:75-81.
14. **Fernández J, Vargas J, López M, Bello F, Ayala M, Moncada L, et al.** Seroprevalencia de leishmaniosis visceral canina en la comuna 8 de Neiva y en cuatro municipios de Huila, Colombia. Biomédica. 2006;26:121-30.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1506>
15. **Mantilla JC, Suárez EU, Barraza MF.** Enfermedad de Chagas: correlación clínico-patológica. Serie de casos del Hospital Universitario de Santander - Departamento de Patología, Universidad Industrial de Santander. Revista Colombiana de Cardiología. 2011;18:249-61.
16. **Reyes M, Torres A, Esteban L, Florez M, Angulo VM.** Riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas por intrusión de triatomíneos y mamíferos silvestres en Bucaramanga, Santander, Colombia. Biomédica. 2017;37:68-78.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3051>
17. **Zambrano-Hernandez CP, Ayala-Sotelo MS, Fuya-Oviedo OP, Barraza OC, Rodríguez-Toro G.** Cartagena: nuevo foco de leishmaniasis visceral urbana en Colombia. Ciencia en Desarrollo. 2016;7:83-91.
<https://doi.org/10.19053/01217488.4234>
18. **Dantas-Torres F.** The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia)*

braziliensis. Vet Parasitol. 2007;149:139-46.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.007>

19. **Jaimes-Duenez J, Triana-Chavez O, Cantillo-Barraza O, Hernandez C, Ramirez JD, Gongora-Orjuela A.** Molecular and serological detection of

Trypanosoma cruzi in dogs (*Canis lupus familiaris*) suggests potential transmission risk in areas of recent acute Chagas disease outbreaks in Colombia. Prev Vet

Med. 2017;141:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.03.009>

20. **Ramirez JD, Turriago B, Tapia-Calle G, Guhl F.** Understanding the role of dogs (*Canis lupus familiaris*) in the transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi*

genotypes in Colombia. Vet Parasitol. 2013;196:216-9.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.054>

21. **Paternina M, Díaz Y, Paternina LE, Bejarano EE.** Alta prevalencia de infección por *Leishmania* (Kinetoplastidae: Trypanosomatidae) en perros del norte

de Colombia. Biomédica. 2013;33:375-82.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i3.780>

22. **DANE presentación región Caribe.** Censo Nacional de Población y

Vivienda 2018 y desafíos socioeconómicos para la región Caribe. Fecha de

consulta: 1 de agosto de 2021. Disponible en:

<https://www.dane.gov.co/files/censo2018/informacion-tecnica/presentaciones-territorio/080819-CNPV-presentacion-RegionCaribe.pdf>

23. **Afanador L, Hadley S, Kelly JD.** Adoption of a mini-prep DNA extraction method for RAPD marker analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Bean Improv Coop.* 1993;36:10-11.
24. **Kent RJ, Norris DE.** Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:336-42.
25. **El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, El Safi SH, et al.** *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp Parasitol.* 2001;97:35-44.
<https://doi.org/10.1006/expr.2001.4592>
26. **Lozano-Sardaneta YN, Sánchez-Montes S, Sánchez-Cordero V, Becker I, Paternina LE.** Molecular detection of *Leishmania infantum* in sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Veracruz, Mexico. *Acta Tropica.* 2020;207:105492. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105492>
27. **Gualda KP, Marcussi LM, Neitzke-Abreu HC, Aristides SM, Lonardoni MV, Cardoso RF, et al.** New primers for detection of *Leishmania infantum* using Polymerase Chain Reaction. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015;57:377-83.
<https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500002>
28. **Martínez LP, Rebollo J, Luna AL, Cochero S, Bejarano EE.** Molecular identification of the parasites causing cutaneous leishmaniasis on the Caribbean coast of Colombia. *Parasitol Res.* 2010;106:647–52.
<https://doi.org/10.1007/s00436-009-1712-6>

29. **Dweik A, Schonian G, Mosleh IM, Karanis P.** Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 and HaeIII) for the detection of *Leishmania* species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material. *Ann Trop Med Parasitol.* 2007;101:399-407. <https://doi.org/10.1179/136485907X176436>
30. **Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G.** Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol.* 2010;10:238-45. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.007>
31. **Monroy-Ostria A, Nasereddin A, Monteon VM, Guzman-Bracho C, Jaffe CL.** ITS1 PCR-RFLP diagnosis and characterization of *Leishmania* in clinical samples and strains from cases of human cutaneous leishmaniasis in States of the Mexican Southeast. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2014;2014:607287. <https://doi.org/10.1155/2014/607287>
32. **Montalvo AM, Monzote L, Fraga J, Montano I, Muskus C, Marin M, et al.** PCR-RFLP y RAPD para la tipificación de *Leishmania* neotropical. *Biomédica.* 2008;28:597-606. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i4.66>
33. **Céspedes-Chaves E, Portillo N, Thomaz-Soccol V, Gonçalves AL, González-Brítez N.** Estandarización de la técnica de PCR-RFLP de la región ITS1, para la caracterización molecular de *Leishmania (L.) infantum*, en muestras caninas. *Mem Inst Investig Cienc Salud.* 2016;14:24-33.
34. **Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K.** MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35:1547-9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

35. **Piron M, Fisa R, Casamitjana N, Lopez-Chejade P, Puig L, Verges M, et al.** Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*. 2007;103:195-200.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.05.019>.
36. **Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro A, Pereira JB, Coura JR, et al.** *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic Chagasic patients from Northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Exp Parasitol*. 1995;81:462-71.
<https://doi.org/10.1006/expr.1995.1139>
37. **Hernandez C, Salazar C, Brochero H, Teheran A, Buitrago LS, Vera M, et al.** Untangling the transmission dynamics of primary and secondary vectors of *Trypanosoma cruzi* in Colombia: parasite infection, feeding sources and discrete typing units. *Parasit Vectors*. 2016;9:620. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1907-5>
38. **Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al.** International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5:e931-e. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000931>
39. **Vasquez C, Robledo S, Calle J, Triana O.** Identificación de nuevos escenarios epidemiológicos para la enfermedad de Chagas en la región momposina, norte de Colombia. *Biomédica*. 2013;33:526-37.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i4.836>

40. **Attipa C, Solano-Gallego L, Papasouliotis K, Soutter F, Morris D, Helps C, et al.** Association between canine leishmaniosis and *Ehrlichia canis* co-infection: a prospective case-control study. *Parasit Vectors*. 2018;11:184. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2717-8>
41. **Cardinot CB, Silva JE, Yamatogi RS, Nunes CM, Biondo AW, Vieira RF, et al.** Detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, and *Toxoplasma gondii* DNA in the brain of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Parasitol*. 2016;102:275-9. <https://doi.org/10.1645/15-821>
42. **Mekuzas Y, Gradoni L, Oliva G, Foglia Manzillo V, Baneth G.** *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15(Suppl. 2):30-31. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02150.x>
43. **Galay RL, Manalo AAL, Dolores SLD, Aguilar IPM, Sandalo KAC, Cruz KB, et al.** Molecular detection of tick-borne pathogens in canine population and *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks from southern Metro Manila and Laguna, Philippines. *Parasit Vectors*. 2018;11:643. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3192-y>
44. **Inokuma H, Fujii K, Okuda M, Onishi T, Beaufils JP, Raoult D, et al.** Determination of the nucleotide sequences of heat shock operon groESL and the citrate synthase gene (gltA) of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* for phylogenetic and diagnostic studies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9:1132-6. <https://doi.org/10.1128/cdli.9.5.1132-1136.2002>

45. **Londoño B A, Monsalve B S, Rodas G J, González–Alvarez D, Cabrera J A, Posada-Zapata J.** Identification of bacteria from the Anaplasmataceae family in dog shelter of the municipality of Caldas, Antioquia. *Revista MVZ Córdoba.* 2017;22:6014-22.
46. **Pérez Pérez JC, Montoya Ruiz C, Arroyave Sierra E, Paternina LE, Rodas JD.** Design and analytical validation of a duplex PCR for *Ehrlichia* and *Rickettsia* detection in ticks. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 2018;31:285-94. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v31n4a05>
47. **R Core Team.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna: R Core Team; 2021.
48. **QGIS Development Team 2020.** QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. Fecha de consulta: 1 de agosto de 2020. Disponible en: <https://qgis.org>
49. **Pereira Bengoa V.** La historia clínica y el consentimiento informado en medicina veterinaria en Colombia: generación de instrumentos y sus reglas de organización y manejo. Bogotá, D. C: Consejo Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Colombia; 2018.
50. **Travi BL.** Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. *Biomédica.* 2014;34:7-12. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.2153>.

51. **Aagaard-Hansen J, Nombela N, Alvar J.** Population movement: a key factor in the epidemiology of neglected tropical diseases. *Trop Med Int Health.* 2010;15:1281-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02629.x>
52. **Costa CH, Werneck GL, Rodrigues L, Jr., Santos MV, Araujo IB, Moura LS, et al.** Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.* 2005;99:229-36. <https://doi.org/10.1179/136485905X28018>
53. **World Health Organization.** Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires: WHO; 2005. p. 104. Fecha de consulta: 1 de agosto de 2020. Disponible en http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69724/TDR_SWG_09_spa.pdf?sequence=1
54. **Organización Mundial de la Salud.** Control de las leishmaniasis. Ginebra: OMS; 2010. Fecha de consulta: 1 de agosto de 2020. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/82766>
55. **Travi B, Tabares C, Cadena H.** *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in two Colombian dogs: a note on infectivity for sand flies and response to treatment. *Biomédica.* 2006;26:249-53. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1520>
56. **Bejarano EE, Rojas W, Uribe S, Vélez ID, Charles HP.** Genetic analysis of a recently detected urban population of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) in Colombia. *Rev Soc Entomol Argent.* 2009;68:135-41.

57. **Cortés LA, Fernández J.** Especies de *Lutzomyia* en un foco urbano de leishmaniasis visceral y cutánea en El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. *Biomédica*. 2008;28:433-40. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v28i3.81>
58. **Lambraño Cruz LF, Manjarrez Pinzón G, Bejarano Martínez EE.** Variación temporal de especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en el área urbana de Sincelejo (Colombia). *Salud Uninorte*. 2012;28:191-200.
59. **Rivero R. Matilde E. Pérez D. Alveiro J, & Bejarano Eduar E.** Detección de *Leishmania* spp. en población canina (*Canis familiaris*) del área urbana del municipio de Ovejas, Sucre. [Tesis maestría]. Sincelejo: División de Bibliotecas e información científica, Universidad de Sucre, 2016. p. 102.
60. **Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD, Barazarte R, Travi BL, Lane RP.** Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Trop*. 2003;85:19-29. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(02\)00189-4](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(02)00189-4)
61. **Travi B, Ferro C, Cadena H, Montoya-Lerma J, Adler GH.** Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. *Res Vet Sci*. 2002;72:83-6. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2001.0527>
62. **Rivero Rodríguez ME, Rodríguez Jiménez JL, Pérez-Doria AJ, Bejarano Martínez EE.** Aislamiento de *Leishmania infantum* a partir de *Canis familiaris* en área urbana del Caribe colombiano. *Rev Investig Vet Perú*. 2018;29:923-30. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i3.13708>

63. **Arbelaez N, Moreno J, Murillo J, Montoya A, Robledo SM, Velez A, et al.** First report of an urban case of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Cali, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2020;102:289-93.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0515>
64. **Jaimes-Dueñez J, Jiménez-Leaño ÁP, Esteban-Mendoza M, Moreno-Salcedo LA, Triana-Chávez O, Cantillo-Barraza O.** Epidemiological and clinical characteristics of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs (*Canis lupus familiaris*) from a Chagas Disease-Endemic Urban Area in Colombia. *Prev Vet Med.* 2020;182:105093. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105093>
65. **Manrique-Abril D, Manrique-Abril F, Lorca M, Ospina J.** Prevalence of antibodies for *Trypanosoma cruzi* in canines from two endemic municipalities of Boyacá. *Rev MVZ Córdoba.* 2012;17:2916-23.
66. **Gobernación de Sucre.** Por lo menos, 20 profesionales de la Secretaría de Salud estarán este 10 de enero en El Sitio. Fecha de consulta: 1 de agosto de 2020. Disponible en: <http://www.sucre.gov.co/noticias/por-lo-menos-20-profesionales-de-la-secretaria-de-salud>
67. **de Oliveira-Porfirio GE, Santos FM, Carvalho de Macedo G, Gomes Barreto WT, Campos JBV, Meyers AC, et al.** Maintenance of *Trypanosoma cruzi*, *T. evansi* and *Leishmania* spp. by domestic dogs and wild mammals in a rural settlement in Brazil-Bolivian border. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2018;7:398-404. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.10.004>

68. **Fernandez AR, Pimenta CL, Vidal IF, Oliveira GC, Sartori RS, Araujo RB, et al.** Risk factors associated with seropositivity for *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* in dogs in the state of Paraiba, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2016;25:90-8. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016010>
69. **Gurtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Cardinal MV, Kitron U, Cohen JE.** Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. Parasitology. 2007;134:69-82. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001259>

Cuadro 1. Evaluación de asociación entre variables registradas y positividad a *Leishmania* (L+), *T. cruzi* (Tc+) y Anaplasmatáceos (ATG+) en caninos residentes del área urbana de Sincelejo. Los valores de probabilidad (p) en **negrilla** se consideraron estadísticamente relevantes ($p < 0.05$).

Variable	Categorías	Muestra	L+	p	Tc+	p	ATG+	p
Sexo	Hembra	50	16	1	5	0,758	14	0,019
	Macho	50	16		7		4	
Grupo Etario	Adulto	70	25	0,381	9	0,898	16	0,114
	Cachorro	12	2		1		0	
	Senil	18	5		2		2	
Raza	Beagle	2	0	0,701	0	0,810	0	0,906
	Boston Terrier	2	0		0		0	
	Bulldog Frances	6	3		1		1	
	Bulldog Inglés	1	0		0		0	
	American Bully	1	0		0		0	
	Chow Chow	1	0		0		0	
	Cocker	2	0		0		1	
	Dogo Argentino	1	1		0		0	
	Golden	2	0		0		0	
	Husky	6	3		1		1	
	Labrador	4	1		0		1	
	Mestizo	19	9		3		2	
	Pincher	13	3		3		4	
	Pitbull	1	0		0		1	
	Pointer	1	0		1		0	
	French Poodle	15	4		1		2	
	Pug	5	2		0		1	
	Rottweiler	1	0		0		0	
Schnauzer	7	4	1	1				
Shih Tzu	4	1	1	1				
Yorky	6	1	0	2				
Comuna	C2	14	5	0,279	1	0,670	2	0,806
	C3	19	3		4		2	
	C4	19	9		3		4	
	C5	13	3		0		4	
	C6	3	0		0		1	
	C7	28	10		4		5	
	C8	3	1		0		0	
C9	1	1	0	0				

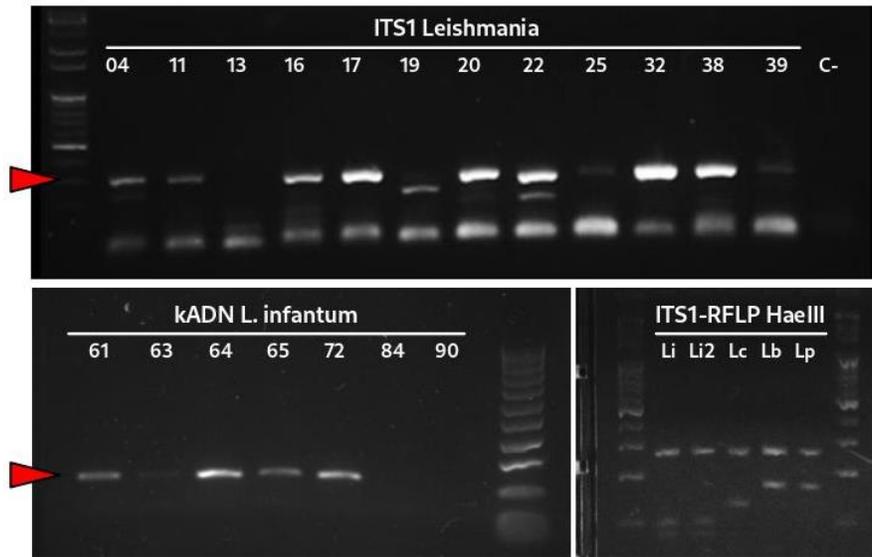


Figura 1. Electroforesis en geles de agarosa al 1.5% de la PCR para *Leishmania* spp. (ITS1, panel superior). En los paneles inferiores se observa la detección específica del kADN *L. infantum* (izquierda), así como los perfiles de restricción ITS1 con HaeIII para cepas de referencia de *L. infantum* (Li y Li2), *L. colombiensis* (Lc), *L. braziliensis* (Lb) y *L. panamensis* (Lp) (derecha).

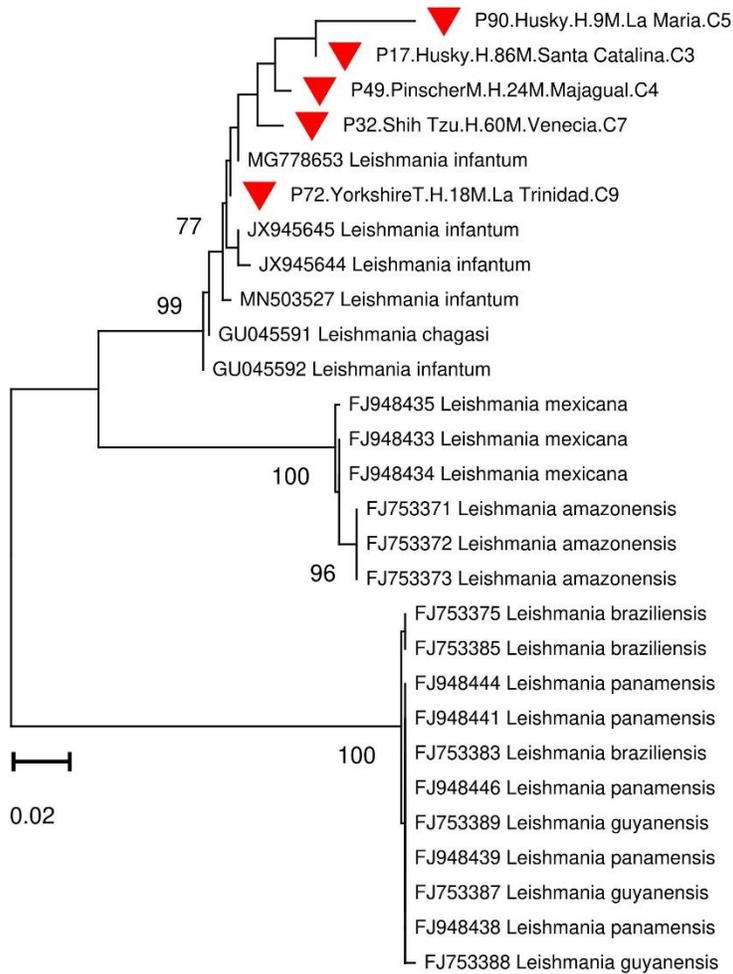


Figura 2. Dendrograma Neighbor-Joining (distancias K2P) de comparaciones pareadas de ITS1 de *Leishmania* spp. obtenidos de perros de la zona urbana de la ciudad de Sincelejo (triángulo rojo). Los códigos de estas secuencias presentan información adicional del perro como la raza, sexo, edad (en meses), barrio y comuna de procedencia.

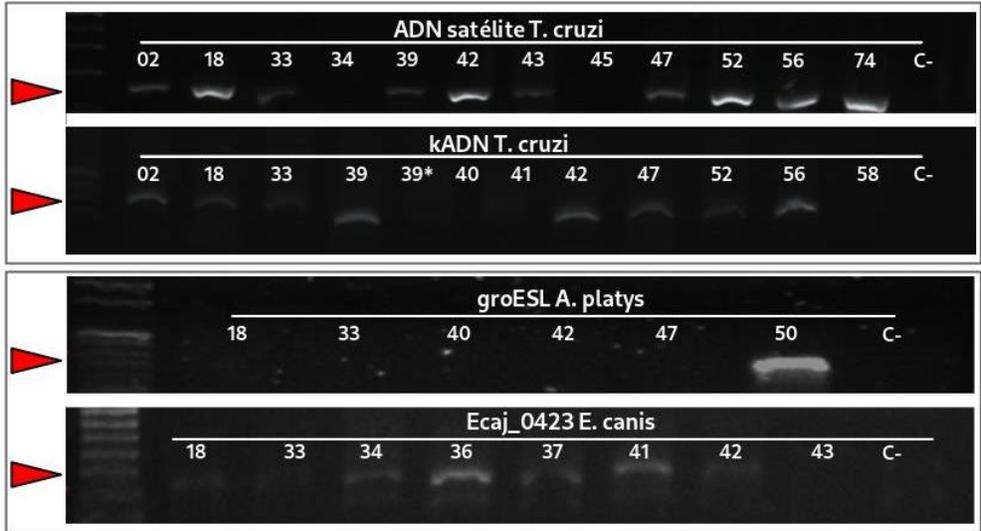


Figura 3. Electroforesis en geles de agarosa 1.5% de productos de PCR de tamaño esperado para *T. cruzi* (ADN satélite y kADN, panel superior) y PCR específicas contra agentes transmitidos por garrapatas, *A. platys* y *E. canis* (panel inferior).

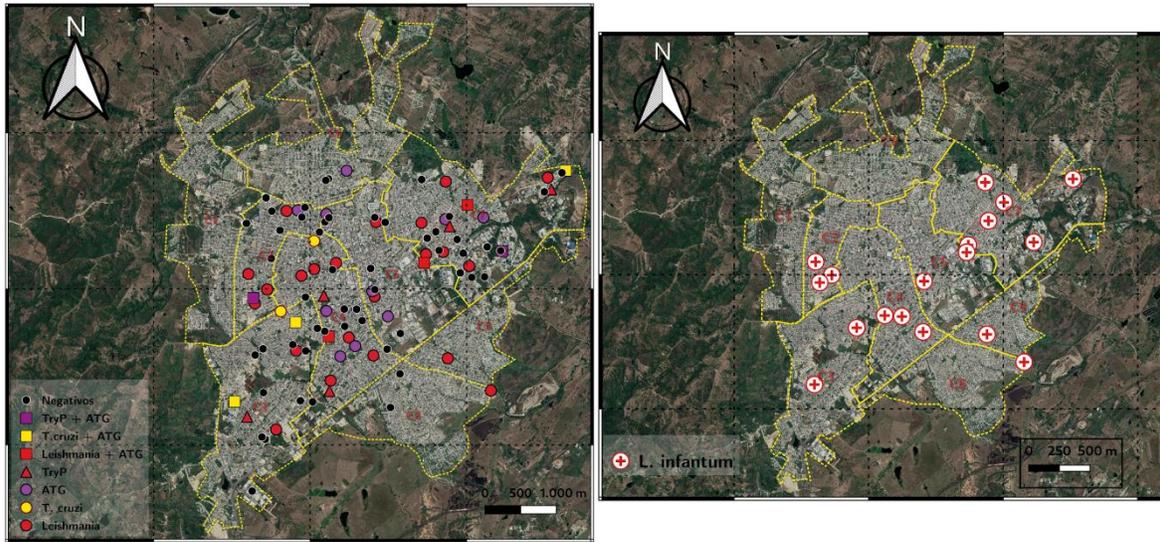


Figura 4. Distribución espacial de parásitos tripanosomátidos y anasplasmátáceos (panel izquierdo) detectados en caninos, y distribución de *L. infantum* (panel derecho) en perros residentes de la zona urbana del municipio de Sincelejo. TryP: coinfección *Leishmania-T. cruzi*, ATG: infección por *E. canis* y/o *A. platys*.