

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Detección de *Leishmania sp.* en garrapatas de la Reserva de la Biósfera
Maya, Guatemala, 2022-2023

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por

Miguel Ángel Véliz Pernilla

para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Detección de *Leishmania sp.* en garrapatas de la Reserva de la Biósfera
Maya, Guatemala, 2022-2023

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por

Miguel Ángel Véliz Pernilla

para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

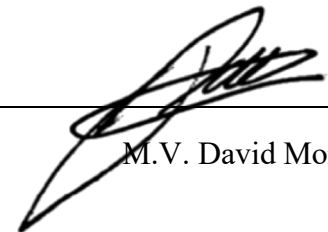
2024

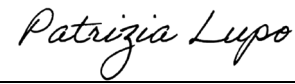
Vo. Bo.

(f) 
M.Sc. Renata Mendizábal de Cabrera

Tribunal Examinador:

(f) 
M.Sc. Renata Mendizábal de Cabrera

(f) 
M.V. David Morán

(f) 
PhD. Patrizia Lupo

Fecha de aprobación: Guatemala, 29 de enero de 2024

Índice

<i>Lista de cuadros</i>	<i>iv</i>
<i>Lista de figuras</i>	<i>v</i>
<i>Resumen</i>	<i>vi</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
A. Objetivo general:.....	2
B. Objetivos específicos:.....	2
III. JUSTIFICACIÓN	3
IV. MARCO TEÓRICO	4
A. Garrapatas como vectores de enfermedades	4
B. Géneros comunes de garrapatas.....	4
C. Ciclo de vida de las garrapatas	5
D. Enfermedades comúnmente transmitidas por garrapatas.....	6
1. Enfermedad de Lyme.....	6
2. Rickettsiosis	6
3. Trypanosomiasis	7
E. Leishmaniasis	7
F. Tipos de leishmaniasis	8
1. Leishmaniasis cutánea	8
2. Leishmaniasis visceral	8
3. Leishmaniasis mucocutánea.....	9
G. Respuesta del sistema inmune ante la leishmaniasis.....	9
H. Garrapatas como vectores de <i>Leishmania sp.</i>	10
1. Casos de infección de garrapatas con <i>Leishmania</i>	10
I. Herramientas para análisis molecular	10
1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	10
2. Citocromo oxidasa I en eucariotas	11
3. Subunidad pequeña ribosomal en <i>Leishmania sp.</i>	12
V. ANTECEDENTES	13
A. Recolección de la muestra	13
B. Extracción de ADN	13

VI. METODOLOGÍA.....	14
A. Sitio de estudio.....	14
B. Enfoque, diseño y tipo de investigación	15
C. Hipótesis.....	15
D. Variables	16
E. Criterios de inclusión	16
F. Tipo y tamaño de muestra.....	16
G. Procedimiento.....	17
1. Control de amplificación	17
2. Amplificación del gen <i>hsp70</i> de <i>Leishmania sp.</i> por PCR.....	18
3. Amplificación del gen <i>SSU</i> de <i>Leishmania sp.</i> por PCR.....	21
4. Electroforesis	22
5. Análisis de datos.....	22
6. Consideraciones éticas	22
VII. RESULTADOS.....	23
A. Características de las muestras.....	23
B. PCR y electroforesis del gen citocromo oxidasa I (<i>COI</i>).....	23
C. PCR y electroforesis del gen <i>hsp70</i> de <i>Leishmania spp.</i>	24
D. PCR y electroforesis del gen de la subunidad pequeña de ARN ribisomal (<i>SSU</i>) de <i>Leishmania spp.</i>	24
E. Análisis de datos.....	27
1. Análisis en BLAST	27
2. Tasa de amplificación o infección de garrapatas	30
3. Prueba Chi cuadrado.....	30
VIII. DISCUSIÓN.....	31
IX. CONCLUSIONES.....	36
X. RECOMENDACIONES.....	37
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
XII. ANEXOS.....	47

Lista de cuadros

<i>Cuadro 1: Sitios de recolección de las garrapatas analizadas, localidad y municipio.....</i>	<i>14</i>
<i>Cuadro 2: Variables de la investigación</i>	<i>16</i>
<i>Cuadro 3: Parámetros de optimización de la amplificación por PCR del gen hsp70</i>	<i>20</i>
<i>Cuadro 4: Localidad y origen de las muestras de garrapata analizadas.....</i>	<i>23</i>
<i>Cuadro 5: Resultados de la amplificación de los genes del citocromo oxidasa I (COI) y subunidad ribosomal pequeña de Leishmania spp. (SSU) en las muestras de garrapatas analizadas</i>	<i>25</i>
<i>Cuadro 6: Porcentaje de positividad de amplificación de los genes analizados en garrapatas</i>	<i>30</i>
<i>Cuadro 7: Resultados de prueba de Chi cuadrado</i>	<i>30</i>

Lista de figuras

- Figura 1: Sitios de recolección de las garrapatas en la Reserva de la Biósfera Maya, Petén, Guatemala, en el período 2022-2023: 15***
- Figura 2: Gel de electroforesis de los productos de amplificación por PCR del gen COI de muestras de garrapatas recolectadas en la Reserva de la Biósfera Maya 24***
- Figura 3: Gel de electroforesis con los productos de amplificación por PCR del gen SSU de Leishmania spp. en muestras de garrapatas recolectadas en la Reserva de la Biósfera Maya 26***
- Figura 4: Análisis de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de productos esperados a partir de las secuencias de primers utilizados para el gen SSU de Leishmania spp. 28***

Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad considerada entre las enfermedades tropicales desatendidas, con muy pocos estudios de su control preventivo, incluyendo los vectores y reservorios de *Leishmania*. Se han reportado casos en los que *Leishmania* ha sido encontrada en garrapatas, especialmente en regiones tropicales como Brasil. También se han reportado casos de perros domésticos, infestados por garrapatas, que han sido infectados con *Leishmania* en regiones donde no se ha encontrado al vector principal de la leishmaniasis, el flebótomo o mosca de la arena. En Guatemala, los departamentos de Petén y Alta Verapaz presentan la mayoría de casos de leishmaniasis cutánea, pero no se han realizado estudios de la presencia de la enfermedad en garrapatas. El presente estudio tuvo como objetivo describir la presencia de *Leishmania sp.* en garrapatas recolectadas en la Reserva de la Biósfera Maya, Petén, Guatemala, en el período 2022-2023. Se utilizó el ADN de las garrapatas recolectadas en un estudio previo y se amplificó el gen de la subunidad ribosomal pequeña (*SSU*) de *Leishmania*. Se obtuvo una tasa de positividad del 13.51% en garrapatas de la especie *Rhipicephalus microplus*. Los análisis bioinformáticos mostraron que los fragmentos amplificados tienen un tamaño similar a secuencias de este gen para la familia Trypanosomatidae, tanto *Leishmania sp.* como *Trypanosoma sp.* Para confirmar los hallazgos se recomienda secuenciar los resultados obtenidos. Sin embargo, este es un acercamiento a una posible detección de *Leishmania*, u otro parásito relacionado, en garrapatas recolectadas en Guatemala, que podría ser de importancia para la salud humana y animal en la región.

I. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos que se caracterizan por ser hematófagos obligados. Debido a esto, son principales vectores de varias enfermedades que pueden comprometer la salud humana y animal. Entre los microorganismos que se han encontrado en las garrapatas se encuentra *Leishmania sp.* Este parásito es el causante de la leishmaniasis, transmitida principalmente por flebótomos. Hasta el momento, no se han realizado estudios acerca de la presencia de *Leishmania sp.* en garrapatas en Guatemala, pero se ha observado que en otros países como Irán (Dabaghmanesh et al., 2016), Italia y Brasil (Dantas-Torres, Lorusso, et al., 2010), se ha detectado *Leishmania sp.*, tanto en el intestino de la garrapata, como en los ovarios (Dantas-Torres, Martins, et al., 2010) y las glándulas salivares (Viol et al., 2016). Además, se ha reportado en Brasil casos de perros domésticos infectados con leishmaniasis, luego de estar infestados por garrapatas, especialmente en regiones donde no se han reportado flebótomos. Asimismo, se ha detectado ADN de kinetoplasto (ADNk) de *Leishmania sp.* en ninfas de garrapatas, así como en garrapatas adultas (de Moraes et al., 2013). Por lo tanto, la detección de este parásito en garrapatas de Guatemala supone una forma de poder detectar de mejor manera esta enfermedad, que afecta tanto en la salud humana como animal.

Se ha observado que los enfoques basados en técnicas como PCR han permitido mejorar el diagnóstico y detección de enfermedades como la leishmaniasis, tanto en seres humanos como en animales domésticos, e incluso en posibles vectores de la enfermedad como flebótomos (Sant'Anna et al., 2008). Esta técnica facilita la detección de *Leishmania sp.* en artrópodos, como garrapatas, especialmente en países donde estos estudios no se han realizado con anterioridad.

Este estudio tiene el objetivo de determinar la presencia de *Leishmania sp.* a través de un análisis molecular, en garrapatas recolectadas en la Reserva de la Biósfera Maya, Petén, Guatemala, en el período 2022-2023. Se ha observado que las garrapatas pueden ser vectores secundarios de *Leishmania sp.*, por lo que es importante determinar si estas garrapatas se encuentran infectadas con *Leishmania sp.* Para lograr esta determinación, se realizó una reacción por PCR del gen de la subunidad ribosomal pequeña (*SSU*) de *Leishmania sp.*, en garrapatas que fueron recolectadas en la Reserva de la Biósfera Maya. Asimismo, se realizó una reacción de PCR del gen de citocromo oxidasa I (*COI*) en las garrapatas analizadas como un control de amplificación.

Se analizaron únicamente las garrapatas pertenecientes al género *Rhipicephalus*, dado que este género es el que se ha reportado la presencia de *Leishmania sp.* (Coutinho et al., 2005). De las garrapatas que amplificaron para el gen *COI* (37 muestras), únicamente 5 amplificaron para el gen *SSU*, teniendo una tasa del 13.51%. Estas muestras que amplificaron para el gen *SSU* mostraron bandas que, tras un análisis de BLAST, se asemejan a bandas pertenecientes a ADN de la familia Trypanosomatidae, como *Trypanosoma sp.* o *Leishmania sp.* Antes de llegar a un resultado definitivo, es necesario secuenciar los resultados. Sin embargo, este es un acercamiento a una posible detección de *Leishmania*, u otro parásito relacionado, en garrapatas recolectadas en Guatemala.

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general:

Describir la presencia de *Leishmania sp.* en garrapatas recolectadas en la Reserva de la Biósfera Maya, Petén, Guatemala, 2022-2023.

B. Objetivos específicos:

- Identificar la presencia de ADN de *Leishmania sp.* en garrapatas de la Reserva de la Biósfera Maya y las comunidades aledañas, a través de análisis molecular del gen *SSU*.
- Determinar si existe asociación entre la infección por *Leishmania sp.* y el hospedero o sitio donde se recolectaron las garrapatas.
- Calcular la tasa de infección por *Leishmania sp.* en garrapatas de la Reserva de la Biósfera Maya y las comunidades aledañas

III. JUSTIFICACIÓN

Las garrapatas son arácnidos de la familia Ixodidae, que se caracterizan por ser hematófagos (se alimentan de sangre). En Centroamérica, la especie más prevalente es la garrapata estrella (*Amblyomma cajennense*) (Almazan et al., 2018). Al ser las garrapatas organismos hematófagos, tienen potencial para transmitir microorganismos que pueden ser agentes causales de enfermedades infecciosas en el hombre y en los animales, especialmente en áreas rurales (Paternina-Gómez et al., 2013). Esto se debe a que estas garrapatas son más propensas a infestar a animales domésticos como perros o ganado, que en áreas rurales están más expuestos a este tipo de artrópodos, llegando a producir zoonosis endémicas, principalmente en estas áreas rurales (Rueda-Concha et al., 2022). Las comunidades aledañas a la Reserva de la Biósfera Maya, al ser regiones de área rural, expuestas a varias especies que viven en la región selvática, hacen que el ganado y otros animales domésticos estén expuestos a estar infestados por animales como las garrapatas, los cuales a su vez pueden transmitir estas enfermedades infecciosas a las personas (Maggi & Krämer, 2019). Sin embargo, el movimiento de estos animales a áreas urbanas también puede significar un riesgo de diseminación de enfermedades en áreas urbanas (Day, 2011). Por lo tanto, la detección de estas enfermedades en estos artrópodos, así como en sus huéspedes como los perros domésticos, es de alta importancia médica para poder reducir los casos de infección por estas enfermedades (Esch & Petersen, 2013).

Un parásito de importancia para la salud pública en la región norte de Guatemala es *Leishmania sp.*, causante de la leishmaniasis cutánea y visceral. En 2018, se observó que la leishmaniasis cutánea tenía una prevalencia de 39.17 por cada 100,000 habitantes en áreas endémicas de Guatemala, especialmente en los departamentos de Alta Verapaz y Petén (Lopez et al., 2023). En países como Brasil, se ha detectado *Leishmania infantum* y *Leishmania braziliensis*, causantes de leishmaniasis cutánea, en garrapatas provenientes de perros. Esto, en regiones donde no se ha encontrado flebótomos, como *Lutzomyia spp.*, que son los vectores primarios de estos parásitos. Esto sugiere que las garrapatas pueden infectarse de *Leishmania spp.*, y podrían incluso tener un rol importante en el aumento de casos de leishmaniasis, especialmente en regiones endémicas como Centroamérica (Millán et al., 2016). Determinar si hay infección por *Leishmania sp.* en las garrapatas recolectadas en la Reserva de la Biósfera Maya es el primer paso para determinar si estos artrópodos podrían tener algún rol en el ciclo de transmisión de la enfermedad y proponer estudios futuros.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Garrapatas como vectores de enfermedades

Las garrapatas son artrópodos acáridos, que se caracterizan por infectar a sus huéspedes en el momento de alimentarse, siendo considerados ectoparásitos de varios vertebrados (Aktas, 2014). Las garrapatas presentan un cuerpo no segmentado y son hematófagos obligados. Las garrapatas se suelen dividir en garrapatas “duras” (como la familia Ixodidae) y garrapatas “blandas” (como la familia Argasidae). Esto se debe a que las garrapatas “duras” tienen una estructura similar a un escudo en sus bocas, mientras que las garrapatas “blandas” carecen de esta estructura. Debido a esto, las garrapatas machos de géneros como *Ixodes* tienden a ingerir una menor cantidad de sangre en comparación con las hembras (Boulanger et al., 2019).

Las garrapatas suelen ser considerados vectores para diversos organismos patógenos, lo cual puede llevar a la transmisión de enfermedades zoonóticas. Al ser ectoparásitos, las garrapatas utilizan sus quelíceros para penetrar la epidermis y poder alimentarse de la sangre de sus huéspedes (Boulanger et al., 2019). Parte importante de la alimentación hematófaga de las garrapatas es su saliva, que presenta varias proteínas, prostaglandinas y otros péptidos que promueven la coagulación. Asimismo, el pH de la saliva de la garrapata es más básico (~ 9.5), por lo que esto también evita la coagulación, y este cambio puede llegar a ser favorable para patógenos que utilizan a las garrapatas como vectores para infectar a varios hospederos. (Nuttall, 2019).

B. Géneros comunes de garrapatas

Entre las garrapatas “duras” de la familia Ixodidae, se encuentra el género *Rhipicephalus*, el cual es considerado cosmopolita, siendo uno de los géneros de garrapatas más ampliamente distribuidos a nivel mundial (Gray et al., 2013). Una de las especies más conocidas de este género es *Rhipicephalus sanguineus*, comúnmente conocida como la garrapata canina marrón. Esta especie de garrapata, como su nombre lo indica, se caracteriza por infectar principalmente a los perros, aunque también puede infectar a otros animales domésticos, e incluso a los seres humanos, dado que usualmente se encuentra en áreas urbanas y suburbanas, como perreras, casetas de perros e incluso interiores de hogares, buscando principalmente a perros como huéspedes, aunque también pueden infectar a las personas, dueñas de estos perros (Gray et al., 2013). Debido a que esta especie de garrapata predomina más en climas cálidos con inviernos suaves *Rhipicephalus sanguineus* es considerado el vector principal de varios parásitos y bacterias peligrosas para la salud humana y animal, incluyendo a *Rickettsia conorii* (Boulanger et al., 2019) y a *Ehrlichia canis* (Charles et al., 2021). Otras especies de *Rhipicephalus* que también pueden ser vectores de estos parásitos y bacterias patógenas incluyen a *Rhipicephalus microplus* (comúnmente encontrado en el ganado bovino) (Bermúdez C. et al., 2022) y *Rhipicpehalus bursa* (comúnmente observado en cabras y ovejas) (Aktas, 2014).

Otro género de garrapata que también tiene una amplia distribución a nivel global, especialmente en América, es el género *Amblyomma*. Estas garrapatas se caracterizan por tener un tamaño relativamente más grande que otros géneros de garrapatas, y es considerado uno de los géneros de garrapatas más prevalentes en Centroamérica que llegan a parasitar a humanos (Bermúdez C. et al., 2022). Una de las especies de *Amblyomma* que ha despertado bastante interés es *Amblyomma mixtum*, comúnmente conocida como la garrapata estrella solitaria (en ocasiones confundida con *Amblyomma cajennense*) (Almazan et al., 2018). *Amblyomma mixtum* es una de las especies que se han observado parasitar a humanos en los siete países de Centroamérica, incluso en sus etapas de larva y ninfa (Aguilar-Domínguez et al., 2021). Además, se ha observado que los pacientes con mordidas de *Amblyomma mixtum* (así como de *Amblyomma cajennense*) presentan síntomas de rickettsiosis, causada por *Rickettsia rickettsii*, una de las bacterias presentes en estas garrapatas (Bermúdez C. et al., 2022).

Uno de los géneros más comunes de garrapatas, y de donde viene el nombre de la familia Ixodidae, es el género *Ixodes*. Estas garrapatas se caracterizan por un escutelo más pequeño, una estructura de alimentación (quelíceros) de mayor tamaño que otros géneros de garrapatas, y por agruparse en grupos grandes en sus hospederos (Boulanger et al., 2019). Se ha observado que algunas especies de *Ixodes*, como *Ixodes ricinus*, son de gran interés médico, puesto que son los principales vectores de bacterias como *Anaplasma phagocytophilum*, que puede causar anaplasmosis granulocítica humana (HGA por sus siglas en inglés), o *Borrelia burgdorferi*, la bacteria causante de la enfermedad de Lyme, ambos siendo enfermedades de bastante riesgo en humanos si no se recibe tratamiento (Maggi & Krämer, 2019).

C. Ciclo de vida de las garrapatas

El ciclo de vida de las garrapatas usualmente consiste en cuatro etapas: huevo, larva, ninfa y garrapata adulta. Una característica importante en las garrapatas, es que necesitan de ingesta sanguínea entre cada una de estas etapas de su ciclo de vida. Por lo tanto, se considera a la garrapata como un hematófago obligado en todas las etapas de su ciclo de vida (Boulanger et al., 2019).

Tras una ingesta sanguínea completa, la hembra deposita sus huevos, ya sea desprendiéndose del hospedero y desovando en el ambiente, o desovando en el mismo hospedero donde tuvo su ingesta sanguínea. Después de que los huevos eclosionen, salen larvas de seis patas, las cuales también son hematófagas. En esta etapa, la larva requiere de ingesta sanguínea para sobrevivir, por lo que es posible que ciertas bacterias y parásitos ya estén infectando a las larvas, debido a transmisión transovarial. Debido a esto, la etapa de larvas también representa un riesgo potencial a sus hospederos (Dantas-Torres, Martins, et al., 2010). La siguiente etapa del ciclo de vida de la garrapata es en forma de ninfa de ocho patas. Esta ninfa tiene una morfología mucho más similar a una garrapata adulta y de mayor tamaño que la larva. Al igual que las otras etapas de su ciclo de vida, estas ninfas también requieren de una ingesta sanguínea, siendo también un vector para diversas enfermedades en humanos y animales. Después de alimentarse por unos días, la ninfa se suele desprender de su hospedero, y madura hasta su etapa adulta. En esta etapa,

dependiendo de la especie, las diferencias entre las garrapatas macho y hembra suelen ser más notorias, como el tamaño de la garrapata, o del escutelo que presentan. Dependiendo de la especie, las ninfas se dependen de su hospedero y hasta la etapa adulta buscan otro hospedero, o incluso las larvas se pueden desprender de su hospedero antes de madurar en ninfas. A estas especies se les conoce como garrapatas con interacción de dos hospederos o tres hospederos, respectivamente (usualmente estos hospederos son de diferentes especies) (Boulanger et al., 2019). También existen garrapatas de interacción de un solo hospedero, donde la garrapata no cambia de hospedero durante su vida, solo desprendiéndose para desovar (Nyangiwe et al., 2018).

D. Enfermedades comúnmente transmitidas por garrapatas

1. Enfermedad de Lyme

La ingesta sanguínea de las garrapatas durante cada una de las etapas de su ciclo de vida las vuelve vectores de diversos parásitos y bacterias patógenas, que pueden representar un riesgo para la salud humana y animal. Una de las enfermedades más conocidas que es transmitida por garrapatas es la enfermedad de Lyme. Esta enfermedad está asociada a la bacteria *Borrelia burgdorferi*, usualmente transmitida por garrapatas del género *Ixodes*, como *Ixodes ricinus* o *Ixodes scapularis* (Jahfari et al., 2016). El género de bacterias *Borrelia*, al igual que otras bacterias del orden Rickettsiales, se caracteriza por ser intracelulares, y mantenerse dentro del huésped indefinidamente. Entre los principales síntomas se encuentra el sarpullido del tipo eritema migratorio (o migrans), el cual suele localizarse en la región de la picadura de garrapata, y es característico su enrojecimiento en forma de “diana” (Boulanger et al., 2019), así como malestar general y fatiga (Jahfari et al., 2016). Usualmente, el tratamiento se basa en antibióticos de amplio espectro, como doxiciclina o azitromicina (Boulanger et al., 2019).

2. Rickettsiosis

Una de las principales bacterias identificadas en garrapatas en Centroamérica es el género *Rickettsia*, de donde viene el nombre del orden Rickettsiales (Charles et al., 2021). Estas bacterias son intracelulares y usualmente obtienen metabolitos esenciales para su sobrevivencia de la célula huésped. *Rickettsia spp.* se caracteriza por ingresar principalmente en células endoteliales vasculares del hospedero, donde inducen la captación mediada por actina que permite la endocitosis de las bacterias dentro del citoplasma de las células hospederas (Kim, 2022). Algunas especies de *Rickettsia*, como *Rickettsia conorii* o *Rickettsia rickettsii* pueden llegar a provocar enfermedades como la fiebre botonosa mediterránea o la fiebre de las Montañas Rocosas, respectivamente (Charles et al., 2021). La fiebre botonosa mediterránea también ha sido llamada el “tifus de la garrapata”, pues presenta síntomas similares al tifus, aunque usualmente es tratada con antibióticos como doxiciclina o azitromicina (Boulanger et al., 2019). Una de las principales especies de garrapatas vectores de estas especies de *Rickettsia* es *Rhipicephalus sanguineus*, conocida como la garrapata canina marrón, así como *Amblyomma americanum*, conocida como la garrapata (Kim, 2022).

3. Trypanosomiasis

Se han reportado casos en los que se han encontrado parásitos en varios sistemas de la garrapata. Uno de estos parásitos corresponde al género *Trypanosoma*, el cual se ha caracterizado por causar diversas enfermedades como la tripanosomiasis, o la enfermedad de Chagas (causada por *Trypanosoma cruzi*, usualmente a través de vectores como *Triatoma dimidiata* (Moo-Millan et al., 2023)).

E. Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad causada por protozoos del género *Leishmania*, los cuales son transmitidos por la mordedura de moscas flebótomas, también conocidas como moscas de la arena, como los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Burza et al., 2018). Esta enfermedad es considerada entre las enfermedades tropicales desatendidas (o NTDs por sus siglas en inglés), pues los estudios de esta enfermedad han sido muy pocos en esta enfermedad que afecta principalmente a grupos vulnerables bajo la línea de pobreza, y se carece todavía de información clave necesaria para el control preventivo de la enfermedad, incluyendo los vectores y reservorios de *Leishmania* (Lopez et al., 2023). Entre los diferentes tipos de leishmaniasis se encuentra la leishmaniasis cutánea, la leishmaniasis visceral y la leishmaniasis mucocutánea.

El ciclo de vida de *Leishmania* se caracteriza por desarrollarse en dos etapas, una en su hospedero y otra dentro del vector (Reithinger et al., 2007). *Leishmania* es perteneciente a la familia Trypanosomatidae, la cual se caracteriza por poseer un kinetoplasto, una estructura formada por ADN concentrado en forma circular, dentro de la mitocondria de estos protozoos y está asociado a la estructura basal del flagelo (Burza et al., 2018). Además, *Leishmania* presenta diferentes morfotipos en las etapas de su ciclo de vida. Cuando se encuentra dentro del insecto los parásitos son conocidos como promastigotes y cuando se encuentra dentro de las células del mamífero infectado se les llaman amastigotes (Reithinger et al., 2007). Los promastigotes son células alargadas que se caracterizan por poseer un flagelo, mientras los amastigotes son células con forma más ovalada que son más pequeños en relación a los promastigotes y que carecen de flagelo (Esch & Petersen, 2013).

En cuanto al tratamiento de la leishmaniasis, la Organización Panamericana de la Salud (PAHO por sus siglas en inglés) modificó en 2022 sus recomendaciones de tratamiento para la leishmaniasis cutánea para la región de América Latina. Se recomienda como primera opción miltefosina oral, a 2,5 mg/kg/día durante 28 días, así como terapias locales, ya sean antimoniales, intralesionales o termoterapia, en sujetos con tres o menos lesiones de 3 cm de diámetro no localizadas en cara o pequeñas articulaciones (Lopez et al., 2023). Sin embargo, en Guatemala, el tratamiento de primera línea es el antimonio de meglumina (MA por sus siglas en inglés) intramuscular, a 20 mg/kg/peso corporal durante 20 días, así como realizarse exámenes de hematología y electrocardiograma antes y al final del tratamiento en pacientes mayores de 40 años de edad. La directriz nacional también requiere una prueba de embarazo para mujeres en edad

reproductiva antes de iniciar el tratamiento. El Ministerio de Salud proporciona MA sin costo para los pacientes, pero solo se administra a aquellos con un diagnóstico parasitológico confirmado. La termoterapia también se utiliza para pacientes que cumplen los criterios anteriores, una aplicación a 50°C durante 30 segundos (Lopez et al., 2023). Se ha observado que los tratamientos para la leishmaniasis también dependen de la especie de *Leishmania* que está infectando al paciente. Por ejemplo, en un estudio se observó que el tratamiento con miltefosina tenía una mayor eficacia contra infecciones de *Leishmania panamensis* en Colombia, pero su eficacia disminuía drásticamente en pacientes infectados con *Leishmania braziliensis* en Guatemala (Soto et al., 2004).

F. Tipos de leishmaniasis

1. Leishmaniasis cutánea

Uno de los tipos más prevalentes de leishmaniasis en Centroamérica es la leishmaniasis cutánea. Este tipo de leishmaniasis se caracteriza por la aparición de llagas en la piel, principalmente en forma de úlceras expuestas, que pueden llegar a formar cicatrices permanentes. La leishmaniasis cutánea usualmente se divide en leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo y del Nuevo Mundo según las especies de *Leishmania* presentes. En el Viejo Mundo, son más prevalentes *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica* y *Leishmania infantum*, mientras que, en el Nuevo Mundo, son más prevalentes *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania guyanensis* (Burza et al., 2018). En 1988, se identificaron *Leishmania mexicana* y *Leishmania braziliensis* como los agentes causantes de la leishmaniasis cutánea en Guatemala a través de perfiles isoenzimáticos (Lopez et al., 2023). Según datos proporcionados por el Sistema de Información Gerencial de Salud (SIGSA), en 2019 se reportaron 1357 nuevos casos a nivel nacional. En Alta Verapaz se diagnosticaron 831 casos (61%), lo que representa una tasa de incidencia de 72.26 por 100 000 habitantes. En 2018 se reportaron 200 casos de leishmaniasis cutánea y 190 en el 2019, en Cobán, el municipio más endémico de Alta Verapaz (Mendizábal-Cabrera et al., 2021).

2. Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral es considerada una de las enfermedades tropicales desatendidas (NTDs) con mayor tasa de mortalidad. Esto se debe a que la leishmaniasis visceral, causada principalmente por *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum*, presenta síntomas como esplenomegalia, hepatomegalia, fallo multiorgánico, hemorragias, entre otros, pudiendo llevar a la muerte del paciente (Pace, 2014). La leishmaniasis visceral también se puede complicar, convirtiéndose en leishmaniasis dérmica post kala-azar, la cual es muy común en África y Asia, debiéndose a una reacción inmunológica a reservorios de *Leishmania* en el organismo después del tratamiento a la leishmaniasis visceral. A pesar de un tratamiento adecuado, los pacientes de leishmaniasis visceral pueden padecer de una recaída entre 6 y 12 meses después del tratamiento. Se ha considerado al perro doméstico como el principal reservorio de *Leishmania infantum* en Asia, y se cree que el factor de riesgo en Latinoamérica está similarmente relacionado con reservorios de perros domésticos y animales cercanos a ellos, especialmente en comunidades

rurales (Burza et al., 2018). Incluso en regiones de Europa, como Rumania, se ha encontrado alta prevalencia de *Leishmania infantum* en perreras del distrito de Argeş, donde varios de los perros analizados eran asintomáticos, siendo el peligro de transmisión de leishmaniasis incluso mayor (Cazan et al., 2020).

3. Leishmaniasis mucocutánea

La leishmaniasis mucocutánea es una forma menos común de la leishmaniasis, en comparación con la leishmaniasis visceral y la leishmaniasis cutánea. Sin embargo, esta puede provocar daños severos en la mucosa oral y mucosa del tracto respiratorio superior (Pace, 2014). El tratamiento contra la leishmaniasis mucocutánea es más difícil de administrar que otros tipos de leishmaniasis, pues comúnmente se observa en conjunto con infecciones bacterianas. En algunos casos, esta puede llegar a ser fatal (Reithinger et al., 2007).

G. Respuesta del sistema inmune ante la leishmaniasis

Entre las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis, se ha observado que el huésped puede generar una respuesta inmune innata y adaptativa efectiva, la cual está determinada principalmente por factores genéticos y adquiridos. Se ha observado en modelos murinos, que las células CD4+ *T-helper* 1 (T_H1) pueden desempeñar un papel fundamental en el control de la infección, tanto de leishmaniasis cutánea como de leishmaniasis visceral. Esto lo logra mediante una interacción con células presentadoras de antígenos expuestas a *Leishmania*, lo cual libera interferón gamma (IFN- γ). El IFN- γ liberado activa a los macrófagos y los estimula a producir óxido nítrico, lo cual provoca la muerte intracelular de los amastigotes de *Leishmania* (Ikeogu et al., 2020). Esta muerte intracelular depende de la cantidad de óxido nítrico liberado y la influencia supresora de la interleucina 10 (IL-10) producida por las células T reguladoras (Costa-da-Silva et al., 2022). Asimismo, durante una infección por leishmaniasis cutánea, predomina la respuesta de citoquinas T_H2, de manera que disminuye la concentración de interferón gamma (IFN- γ) e interleucina 12 (IL-12), de manera que los linfocitos detectan en menor medida los antígenos de promastigotes y amastigotes de *Leishmania* (Reithinger et al., 2007). Algunos estudios en modelos murinos también han observado un rol importante de las células T reguladoras en el control de leishmaniasis cutánea, en donde se observó una mayor producción de TGF- β 1 e interleucina 10 (IL-10) por parte de células T reguladoras en presencia de *Leishmania braziliensis* (Reithinger et al., 2007).

Las variaciones morfológicas celulares observadas en la leishmaniasis pueden explicarse debido a diferentes polimorfismos en ciertos genes que participan en estas interacciones inmunes. Cabe mencionar que se ha observado que ciertas condiciones inmunosupresoras adquiridas pueden influir en la expresión y modulación de la leishmaniasis. Por ejemplo, se ha observado que pacientes con VIH tienen un mayor riesgo de contraer leishmaniasis cutánea, o incluso leishmaniasis visceral. A su vez, la inmunosupresión derivada de estas infecciones puede acelerar la progresión del SIDA (Pace, 2014).

H. Garrapatas como vectores de *Leishmania sp.*

1. Casos de infección de garrapatas con *Leishmania*

A pesar de que los flebótomos son los principales vectores de *Leishmania*, se han reportado casos en Brasil e Italia, donde se ha detectado leishmaniasis en perros domésticos, pero no se han encontrado los principales vectores. Por lo tanto, se han realizado estudios en otros animales, que podrían ser posibles vectores de *Leishmania*, además de los flebótomos, los vectores principales. En un estudio en dos ciudades de Brasil, se determinó a través de PCR que garrapatas recolectadas de perros estaban infectadas con *Leishmania*, aunque en este estudio no se encontraron promastigotes en frotis de sangre de las garrapatas y solo se llegó a determinar el género, sin llegar a especies (Coutinho et al., 2005). En otro estudio, se determinó a través de PCR y qPCR que un 42.67% de las garrapatas analizadas eran positivas para *Leishmania braziliensis*, siendo una de estas garrapatas positiva, pero extraída de un perro negativo para leishmaniasis. Asimismo, en São Paulo, Brasil, se realizó un estudio en donde se encontraron pulgas y garrapatas positivas para *Leishmania infantum*, en donde se observó ADNk de *Leishmania infantum* a través de PCR. En este estudio, el 50% de las garrapatas adultas analizadas resultaron positivas, y se observó que la infección por *Leishmania* persiste en todos los estadios del ciclo de vida de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Colombo et al., 2011). De igual manera, en otro estudio con perros infestados de garrapatas en Brasil, se determinó por análisis inmunohistoquímicos (IHC) la presencia de promastigotes en el intestino, ovarios y glándulas salivares de las garrapatas (Viol et al., 2016). En Irán, se estudiaron garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* de perros infectados con leishmaniasis visceral canina, y se observó la presencia de ADNk de *Leishmania infantum* (Rakhshanpour et al., 2017). Además, en Brasil se realizaron estudios en los que se encontró que garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* pudieron infectar a hámsteres con *Leishmania chagasi*, sugiriendo la posibilidad de que éstas pudieran llegar incluso a transmitir *Leishmania spp.* a otros hospederos (Coutinho et al., 2005).

I. Herramientas para análisis molecular

1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Durante los últimos 20 años, se ha podido realizar análisis moleculares que facilitan la detección de patógenos en los vectores, de manera que es posible detectar tempranamente si un insecto u otro vector es portador de algún parásito u organismo patogénico. Una técnica que ha sido altamente utilizada para la detección rápida de patógenos causantes de enfermedades es a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (Alberts, 2015).

Una herramienta que se ha utilizado en gran manera durante los últimos años es la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR. Esta técnica se realizó por primera vez en 1983 por Kary Mullis. Esta técnica consiste en el uso de una ADN-polimerasa estable ante altas temperaturas, conocida como *Taq* polimerasa, proveniente de la arqueobacteria *Thermophilus aquaticus*. Esto permite aislar regiones específicas del ADN que se pueden replicar continuamente, durante el

tiempo en que dure la reacción (Karp & Patton, 2013). Para poder llevar a cabo la reacción de PCR, es necesario diseñar cebadores (también conocidos como *primers*) a partir de oligonucleótidos, que se unan a regiones específicas del genoma a estudiar (Alberts, 2015). Una reacción simple para PCR consiste en una mezcla del ADN a amplificar, mezclado con *Taq* polimerasa, los cuatro tipos de desoxirribonucleótidos (conocidos como dNTP's), cloruro de magnesio y buffer de fosfatos para estabilizar la reacción, y los *primers* diseñados para amplificar el gen objetivo. Esta mezcla luego se calienta aproximadamente a 95°C, para desnaturalizar y separar las hebras de ADN, y permitir a la *Taq* polimerasa unirse a una de estas hebras. Luego se baja la temperatura, para que los *primers* puedan hibridizar el gen objetivo (en promedio, esta temperatura suele ser de 60°C, pero puede variar según el tamaño del gen a amplificar). Finalmente, la reacción se calienta nuevamente, aproximadamente a 72°C, para que la *Taq* polimerasa pueda unir los dNTP's a los *primers*, extendiendo la región de ADN amplificada y creando los fragmentos de ADN complementario a la hebra molde. Este proceso se repite varias veces, con el objetivo de poder producir una mayor cantidad de ADN, incluso a partir de muestras muy escasas del ADN original (Karp & Patton, 2013).

La reacción de PCR ha sido utilizada frecuentemente para diversas aplicaciones, desde diagnósticos clínicos hasta en investigaciones forenses (Karp & Patton, 2013). La ventaja de la reacción de PCR es que, al diseñar *primers* específicos para la región objetivo o el gen específico a identificar, es posible detectar con mayor especificidad el gen objetivo. Además, como la amplificación por PCR produce un alto número de copias de la región amplificada, es posible detectar el gen objetivo desde una concentración muy escasa de ADN en la muestra a analizar. Asimismo, si se busca detectar la presencia de un organismo en particular, como una bacteria, parásito o virus, la prueba de PCR es capaz de detectarlo fácilmente. El producto de la reacción de PCR sirve como una manera de detección de este organismo, al visualizarse a través de una electroforesis, o por la secuenciación del producto de PCR (Alberts, 2015).

2. Citocromo oxidasa I en eucariotas

El gen que codifica para la enzima citocromo oxidasa I (también conocido como *COI*) es un gen altamente conservado en los organismos eucariotas. El gen *COI* codifica para la subunidad I del complejo de citocromo oxidasa C, también llamado Complejo IV de la cadena de transporte de electrones (Nelson et al., 2017). Dado que este complejo enzimático se encuentra en las mitocondrias, el gen que lo codifica está altamente conservado, y presente en el genoma de casi todos los eucariotas, por lo que se ha utilizado frecuentemente para estudios filogenéticos en eucariotas. Por consiguiente, el uso del gen *COI* en diagnósticos moleculares ha facilitado la identificación de diferentes especies, incluso algunas que morfológicamente son muy similares (Ren et al., 2018). Además, este gen ha sido utilizado para análisis filogenéticos (Silatsa et al., 2019) y se ha propuesto como un marcador genético de este género de garrapatas (Low et al., 2015). Debido a esto, el gen *COI* se puede utilizar para poder identificar de forma más precisa entre especies de animales, como, por ejemplo, *Rhipicephalus microplus* de *Rhipicephalus sanguineus* (Gou et al., 2018).

3. Subunidad pequeña ribosomal en *Leishmania sp.*

El ARN ribosomal (ARNr) es un ARN que forma parte de los ribosomas, siendo de alta importancia para la síntesis de proteínas. Este ARNr puede producir las subunidades del ribosoma que permiten la traducción del ARN mensajero y sintetizar los aminoácidos a partir de la traducción. Una de estas subunidades se denomina la subunidad ribosomal pequeña (*SSU*), y el gen que codifica para esta subunidad ribosomal es bastante conservado entre especies, como las regiones 16S en procariotas y 18S en eucariotas (Karp & Patton, 2013). Estas regiones en el gen *SSU* han sido ampliamente utilizadas para la identificación de especies y análisis filogenéticos de muchas especies, tanto procariotas como eucariotas (Alberts, 2015). Entre una de las múltiples aplicaciones del uso molecular de este gen es a través de la detección de diversos microorganismos, como levaduras y arqueobacterias (Abellan-Schneyder et al., 2021). Por lo tanto, la versatilidad de este gen es útil para detectar diversos organismos patógenos, como es el caso de *Leishmania*. Cabe mencionar que el gen más utilizado para la detección de *Leishmania* es el gen *hsp70*, que codifica para proteínas de shock térmico, que desencadena el cambio morfológico de promastigotes a amastigotes de *Leishmania* (Folgueira Fernández, 2006). Sin embargo, dado que usualmente la detección del gen *hsp70* utiliza la técnica de PCRs anidados (una reacción de PCR que utiliza productos de un PCR anterior para identificar una región más específica (Van der Auwera et al., 2014)), es posible la identificación de *Leishmania* a través de otros genes conservados, como el gen *SSU*.

V. ANTECEDENTES

A. Recolección de la muestra

Esta investigación se realizó con garrapatas recolectadas por el proyecto “Rickettsiosis en comunidades humanas y animales de la Selva Maya Guatemalteca: una exploración a sus determinantes antropogénicas y ecológicas (Rickettsiosis GIZ)”, el cual está a cargo del Investigador Principal M.V. David Morán, del Programa de Arbovirus y Zoonosis, del Centro de Estudios en Salud del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala. Este proyecto incluyó la recolección de garrapatas de vertebrados en la Reserva de la Biósfera Maya, Petén, Guatemala, en el período 2022-2023, con el objetivo de detectar infección por *Rickettsia spp.* La recolección de garrapatas se realizó en zonas boscosas y comunidades aledañas. Personal del proyecto Rickettsiosis GIZ realizó la clasificación morfológica de las garrapatas recolectadas hasta género, y en algunas muestras, hasta especie. Además, se prepararon *pooles* (grupos) de 1 a 5 garrapatas cada uno en los cuales se incluyeron especímenes del mismo género, recolectados el mismo día, en el mismo vertebrado (o en ambiente) y en la misma ubicación geográfica.

B. Extracción de ADN

La extracción de ADN de los *pooles* de garrapatas fue llevada a cabo por personal del proyecto Rickettsiosis GIZ en el laboratorio de leishmaniasis, del CES-UVG. La extracción se realizó utilizando el kit de extracción y purificación Invitrogen (K0721, Carlsbad, California).

VI. METODOLOGÍA

A. Sitio de estudio

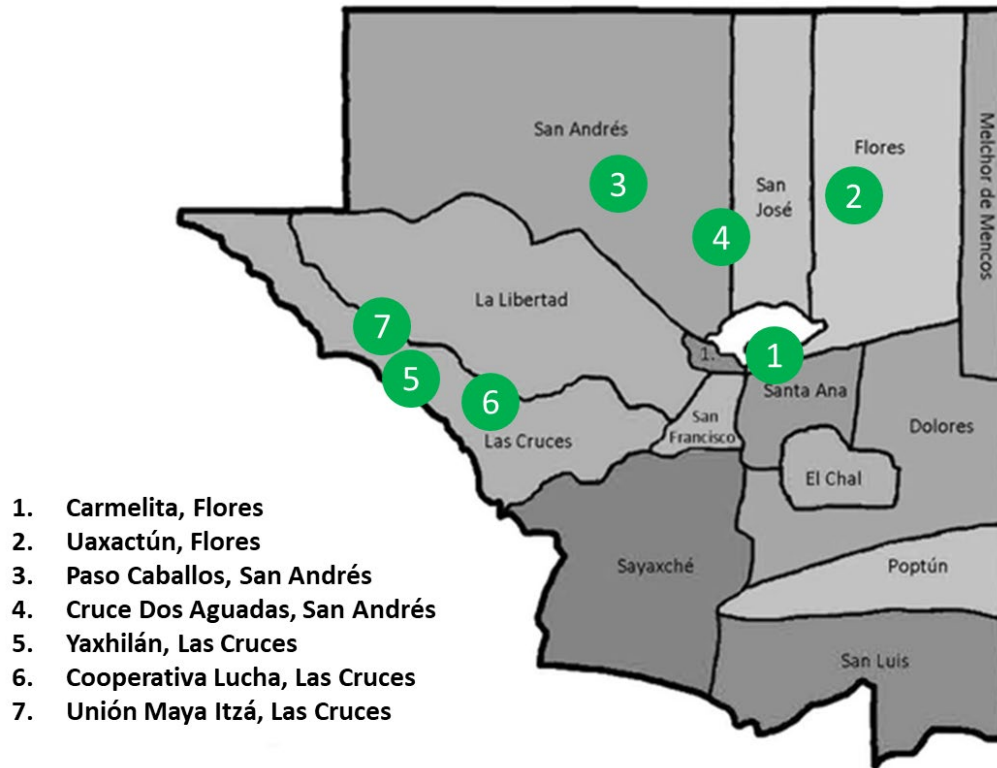
El presente estudio se llevó a cabo en la ciudad de Guatemala, Guatemala, en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, en el Laboratorio de Leishmaniasis del Centro de Estudios en Salud de la misma universidad. Se utilizaron muestras recolectadas por estudios previos del Programa de Enfermedades Arbovirales y Zoonóticas del Centro de Estudios en Salud en la Reserva de la Biósfera Maya, Petén, Guatemala.

Los sitios de recolección de donde proceden las muestras de garrapatas son los siguientes (Cuadro 1, Figura 1):

Cuadro 1: Sitios de recolección de las garrapatas analizadas, localidad y municipio

Localidad	Municipio
Carmelita	Flores
Uaxactún	Flores
Paso Caballos	San Andrés
Cruce Dos Aguadas	San Andrés
Yaxhilán	Las Cruces
Cooperativa Lucha	Las Cruces
Unión Maya Itzá	Las Cruces

Figura 1: Sitios de recolección de las garrapatas en la Reserva de la Biósfera Maya, Petén, Guatemala, en el período 2022-2023:



(Fuente: modificado de FamilySearch Catalog, s.f.)

B. Enfoque, diseño y tipo de investigación

Se trata de un estudio descriptivo, no experimental con enfoque cuantitativo.

C. Hipótesis

- Existe infección por *Leishmania sp* en garrapatas recolectadas en vertebrados y en el ambiente en la Reserva de la Biósfera Maya, Petén Guatemala.
- Existe asociación entre la infección por *Leishmania sp* y el hospedero del que se recolectó la garrapata.
- Existe asociación entre la infección por *Leishmania sp* y la localidad en la que se recolectó la garrapata.

D. Variables

Cuadro 2: Variables de la investigación

Variable	Definición conceptual	Naturaleza	Escala de medición	Unidad de medición
ADN de <i>Leishmania sp.</i>	Material genético de <i>Leishmania spp.</i> , parásito intracelular, causante de la leishmaniasis cutánea o visceral.	Cualitativa	Nominal	Presencia o ausencia
Hospedero	Hospedero o ambiente en donde se recolectaron las garrapatas en la Reserva de la Biósfera Maya.	Cualitativa	Nominal.	Perro Vaca Ambiente Ser humano
Localidad	Asentamiento en donde se recolectaron las garrapatas, en la Reserva de la Biósfera Maya y asentamientos aledaños.	Cualitativa	Nominal	Carmelita, Uaxactún, Paso Caballos, Cruce Dos Aguadas, Yaxhilán, Cooperativa Lucha, Unión Maya Itzá

E. Criterios de inclusión

Pooles conformados por 1 a 5 garrapatas del género *Rhipicephalus*, recolectadas en la Reserva de la Biósfera Maya en el periodo 2022-2023. *Rhipicephalus* es uno de los géneros en que se ha detectado infección por *Leishmania sp.* en países como Irán (Dabaghmanesh et al., 2016), Italia y Brasil (Dantas-Torres, Lorusso, et al., 2010).

F. Tipo y tamaño de muestra

Para este estudio no se realizó un muestreo, ya que se utilizaron todas las muestras que cumplieran con los criterios de inclusión.

G. Procedimiento

1. Control de amplificación

Previo a la amplificación de las muestras de garrapata para identificar ADN de *Leishmania* se realizaron pruebas de amplificación con el gen de citocromo oxidasa I (*COI*), de 712 pares de bases, que es un gen conservado en artrópodos. El objetivo de realizar este PCR fue verificar la presencia de ADN viable en las muestras y evitar falsos negativos en la detección de ADN de *Leishmania*. Para este PCR se incluyeron como controles muestras de *Rhipicephalus* y de flebótomo.

La amplificación del gen *COI* se realizó en un volumen final de 20 μ L, que contenía 1 unidad de polimerasa (Platinum II *Taq* Hot-Start DNA Polymerase, Invitrogen, 14000012), en buffer de reacción conteniendo cloruro de magnesio (concentración final 25 mM) y dNTPs (concentración final 0.2 mM). Además, esta mezcla contenía una concentración final de 0.2 μ M de cada uno de los *primers* HCO2198 y LC1490. Se utilizaron 3 μ L de templado de ADN por cada reacción del PCR. En todas las reacciones de amplificación se utilizó un control de reactivos, con 3 μ L de agua destilada, en lugar de ADN.

Las secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación del gen *COI* (Becker et al., 2021) fueron:

LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'

HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

Para la amplificación se utilizó un termociclador MasterCycler 5331 (Eppendorf®) con los parámetros siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, seguido de la hibridación a 56°C por 1 minuto y la elongación a 68°C por 30 segundos. Transcurridos estos ciclos, se terminó con una elongación final a 68°C durante 5 minutos.

Los productos de PCR se almacenaron a -20°C hasta su visualización por electroforesis en gel de agarosa.

2. Amplificación del gen *hsp70* de *Leishmania sp.* por PCR

La amplificación del fragmento F (1248 pares de bases) del gen codificante de la proteína HSP70 de *Leishmania sp.* se realizó en un volumen final de 20 μL , que contenía 1 unidad de polimerasa (Platinum II *Taq* Hot-Start DNA Polymerase, Invitrogen, 14000012), en buffer de reacción conteniendo cloruro de magnesio (25 mM) y dNTPs (0.2 mM). Además, esta mezcla contenía una concentración final de 0.2 μM de cada uno de los *primers* F25 y R1310 (*primers* para el fragmento F del gen *hsp70*). Se utilizaron 3 μL de ADN para la reacción del PCR, no tomando en cuenta la concentración de este.

Secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación del fragmento F del gen *hsp70*:
F25: 5'-GGACGCCGGCACGATTKCT-3'
R1310: 5'-CCTGGTTGTTGTTTCAGCCACTC-3'
Producto esperado: 1248 pares de bases (pb)

La amplificación del fragmento N (552 pares de bases) se realizó en un volumen final de 20 μL que contenía 2X de Platinum II *Taq* Hot-Start DNA Polymerase (Invitrogen, 14000012), la cual ya contiene buffer de reacción, cloruro de magnesio, dNTPs y *Taq* polimerasa. Además, esta mezcla contenía una concentración final de 0.2 μM de cada uno de los *primers* F25 y R617 (*primers* del fragmento N del gen *hsp70*). Se utilizaron 3 μL de ADN para la reacción del PCR, no tomando en cuenta la concentración de este.

Secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación del fragmento N del gen *hsp70*:
F25: 5'-GGACGCCGGCACGATTKCT-3'
R617: 5'-CGAAGAAGTCCGATACGAGGGA-3'
Producto esperado: 552 pb

Previo a la amplificación de las muestras de ADN de garrapata, se realizó una prueba de control de la amplificación de PCR, en la cual se amplificaron controles positivos de *Leishmania guyanensis* y *Leishmania panamensis*, presentes en el laboratorio de leishmaniasis del Centro de Estudios en Salud, así como muestras positivas de *Leishmania sp.* de un estudio previo (Ruiz Calderón, 2018), para demostrar que la extracción del ADN de las garrapatas fue exitosa. Para todas las amplificaciones, se utilizó un control de reactivos, utilizando 3 μL de agua destilada, en lugar de ADN.

Para la amplificación se utilizó un termociclador MasterCycler 5331 (Eppendorf®) con los parámetros siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, seguido de la hibridación a 56°C por 1 minuto y la

elongación a 68°C por 30 segundos. Transcurridos estos ciclos, se terminó con una elongación final a 68°C durante 5 minutos.

Los productos de PCR se almacenaron a -20°C hasta su visualización por electroforesis en gel de agarosa.

La amplificación con el gen *hsp70* se optimizó utilizando diferentes parámetros y cambios, con el objetivo de tener resultados óptimos de los productos de PCR.

Cuadro 3: Parámetros de optimización de la amplificación por PCR del gen *hsp70*

Elemento	Parámetros
Controles positivos	Se utilizaron tanto controles positivos de <i>Leishmania braziliensis</i> y <i>Leishmania mexicana</i> , como muestras positivas de <i>Leishmania</i> de un estudio previo (Ruiz Calderón, 2018).
Gradiente de temperatura	Se probó una gradiente de temperatura de hibridación entre 41°C y 76°C
Número de ciclos de amplificación	Se probaron 10, 20, 30 y 35 ciclos de amplificación
Tiempo de ciclos de amplificación	Se probaron ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación, desde 30 segundos hasta 120 segundos
Control de reactivos	Se probó un Master Mix convencional vs un Master Mix con Platinum II <i>Taq</i> Hot-Start DNA Polymerase
Uso de potenciador (<i>Enhancer</i>) GC	Se probó la adición de 5 µL de <i>Enhancer</i> GC al Master Mix, con un volumen final de 25 µL
Volumen de ADN por reacción	Se utilizaron diferentes volúmenes de ADN de muestras y controles, desde 5 µL, 3 µL, 1 µL y 0.5 µL
Diluciones de ADN y controles	Se probaron diluciones de ADN de muestra y controles positivos, con diluciones 1:10, 1:100 y 1:1,000
Uso de reactivos y <i>primers</i> nuevos	Dado que los reactivos utilizados se encontraban previamente en el laboratorio, y para evitar riesgo de degradación, se ordenaron nuevos reactivos y una nueva solución de <i>primers</i> para la amplificación de <i>hsp70</i>
Purificación de muestras de garrapata, controles y productos de PCR	Se purificaron las muestras de garrapata y los controles positivos previo a realizar el primer PCR. Asimismo, se probó también purificar los productos del primer PCR para observar si mejoraba la amplificación del PCR anidado
PCR y PCR anidado	Dado que se buscaba observar la amplificación del gen <i>hsp70</i> , se probó la amplificación por un solo PCR y por PCR anidado.

3. Amplificación del gen *SSU* de *Leishmania sp.* por PCR

La amplificación del gen *SSU* (552 pares de bases) del ARNr de *Leishmania* se realizó en un volumen final de 25 μ L, que contenía 1 unidad de polimerasa (Platinum II *Taq* Hot-Start DNA Polymerase, Invitrogen, 14000012), en buffer de reacción conteniendo cloruro de magnesio (25 mM) y dNTPs (0.2 mM). Además, esta mezcla contenía 0.2 μ M del primer SSU561-F y 0.2 μ M del primer SSU561-R, *primers* para el gen *SSU* del ARNr. Se utilizaron 3 μ L de ADN para la reacción del PCR, no tomando en cuenta la concentración de este.

Las secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación del gen *SSU* (Paternina-Gómez et al., 2013) fueron:

SSU561-F: 5'-TGGGATAACAAAGGAGCA-3'

SSU561-R: 5'-CTGAGACTGTAACCTCAAAGC-3'

Previo a la amplificación de las muestras de garrapata, se realizó una prueba control de la amplificación de PCR, en la cual se amplificaron controles positivos de *Leishmania guyanensis* y *Leishmania braziliensis*, presentes en el laboratorio de leishmaniasis del Centro de Estudios en Salud, para demostrar la detección de *Leishmania* y verificar el funcionamiento del PCR. Asimismo, en la amplificación de las muestras de ADN extraído de garrapata, se utilizó un control positivo que consistía en la mezcla de ADN de garrapata con ADN de un control positivo de *Leishmania guyanensis*, para determinar que la amplificación no se viera afectada por la presencia de posibles inhibidores en el material extraído de las garrapatas. Para todas las amplificaciones, se utilizó un control de reactivos, utilizando 3 μ L de agua destilada, en lugar de ADN.

Las condiciones de la amplificación utilizadas en termociclador MasterCycler 5331 (Eppendorf®) fueron las siguientes: para la amplificación del gen *SSU*, se desnaturalizó el ADN a 94°C por 5 minutos. Después, se realizaron 35 ciclos con una desnaturalización a 94°C por 1 minuto, seguido de la hibridación a 54°C por 1 minuto, y la elongación a 72°C por 1 minuto. Transcurridos estos ciclos, se terminó con una elongación final a 72°C durante 5 minutos. Este protocolo de amplificación se obtuvo a partir de un procedimiento estandarizado previamente (Paternina-Gómez et al., 2013).

Los productos de PCR se almacenaron a -20°C hasta su visualización por electroforesis en gel de agarosa.

4. Electroforesis

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) con buffer Tris borato EDTA (TBE), conteniendo 1.5 μL de SYBR Safe (Invitrogen S33102). Se cargó en el gel una mezcla de 3 μL de marcador de masa molecular de 100 pb (Invitrogen 10488058) y 1 μL de buffer de corrida 6X (Invitrogen 10482035). Este buffer de corrida también se utilizó para cargar en el gel una mezcla de 4 μL de cada producto de PCR y 1 μL del buffer de corrida. La electroforesis se realizó a 100 V durante 30 minutos (17 V/cm). Transcurrido este tiempo, se colocó el gel en un transiluminador UV para visualizar los productos del PCR y documentar mediante una fotografía.

5. Análisis de datos

Se realizó un alineamiento *in silico* de las secuencias de los *primers* SSU561-F y SSU561-R, para determinar qué organismos podrían presentar una amplificación positiva, generando bandas del tamaño obtenido en el gel de electroforesis del gen *SSU*. Para ello, se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (Altschul et al., 1990).

Además del análisis bioinformático, se calculó la tasa de positividad de las garrapatas para ADN de *Leishmania*, o algún otro parásito relacionado, determinando el porcentaje de garrapatas que amplificaron para el gen *SSU*. Con el objetivo de determinar si existe una relación entre la infección por *Leishmania sp.* y el hospedero o localidad donde se recolectaron las garrapatas, se realizó una prueba de Chi cuadrado (χ^2).

6. Consideraciones éticas

Durante el desarrollo de este estudio, el estudiante no tuvo contacto con los participantes o vertebrados de los que se recolectaron las muestras de garrapatas, dado que las mismas fueron recolectadas por el equipo del proyecto Rickettsiosis GIZ. No se realizó una recolección de muestras adicionales. Además, se trabajó con una base de datos que incluía solamente los códigos de las muestras y no se tuvo acceso a información privada identificable de los hospederos o sitios de colecta. El Investigador Principal del estudio obtuvo autorización del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad del Valle de Guatemala (propuesta I – 2022 (1)), previo al inicio del proyecto.

VII. RESULTADOS

A. Características de las muestras

Las muestras fueron recolectadas en varias localidades del Departamento de Petén. Las garrapatas luego fueron separadas morfológicamente por especie, y luego se agruparon en *pooles*, de entre 1 y 5 garrapatas, incluyendo larvas, ninfas y hembras adultas (completas o incompletas). Para este estudio únicamente se incluyeron muestras de ADN extraído exclusivamente de garrapatas pertenecientes al género *Rhipicephalus*. De las 45 muestras de *Rhipicephalus* analizadas, la mayoría se recolectaron en Cruce Dos Aguadas, San Andrés y Cooperativa Lucha, Las Cruces. Asimismo, la mayoría de las muestras analizadas fueron recolectadas de perros y de ganado bovino (Cuadro 4).

Cuadro 4: Localidad y origen de las muestras de garrapata analizadas

Localidad	Origen de las garrapatas					Total por localidad
	Perro	Vaca	Cabra	Ambiente	Persona	
Cruce Dos Aguadas	5	17	0	0	0	22
Cooperativa Lucha	9	2	1	4	0	16
Unión Maya Itzá	0	3	1	0	0	4
Yaxhilán	0	0	0	1	0	1
Poptún*	1	0	0	0	0	1
Dolores*	0	0	0	0	1	0
Total por origen	15	22	2	5	1	45

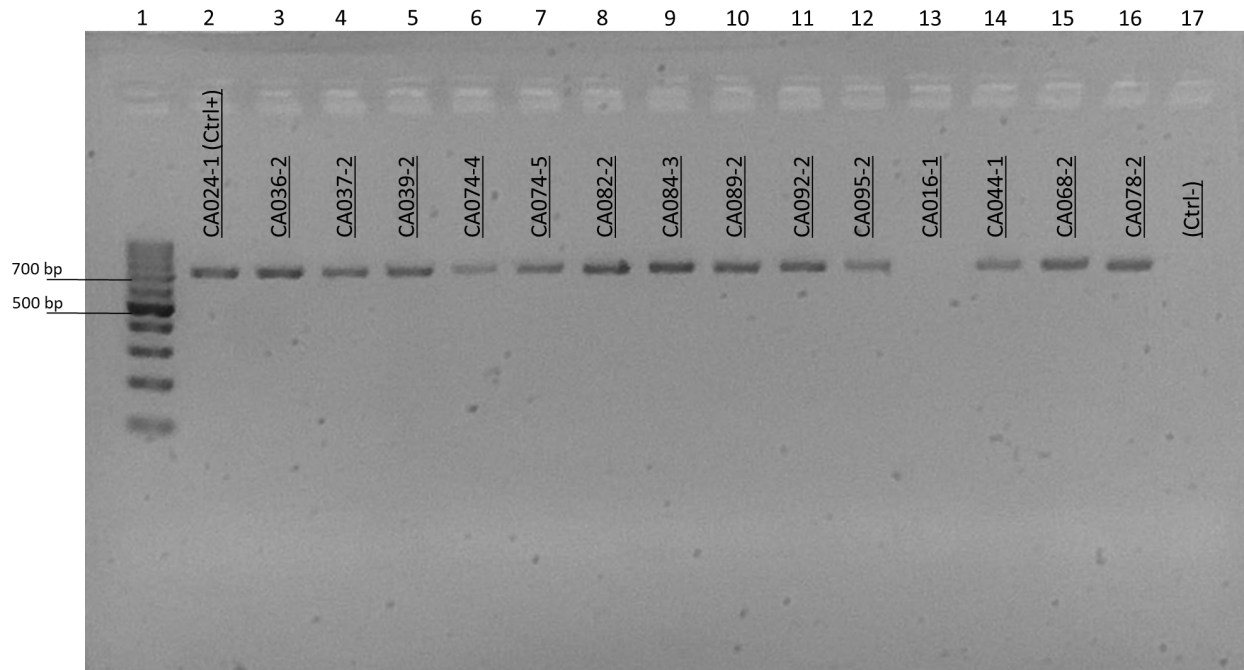
*Sin dato de localidad. Únicamente de municipio.

B. PCR y electroforesis del gen citocromo oxidasa I (*COI*)

Para la amplificación del gen *COI*, se obtuvieron productos de un tamaño aproximado de 700 pb. Se obtuvo una amplificación del citocromo oxidasa I para el 82.2% de las muestras (37 de las 45 muestras de garrapatas). Se observó que las muestras que no amplificaron para el gen citocromo oxidasa I corresponden a la muestra tomada de persona en el municipio de Dolores, así como 2 muestras recolectadas del ambiente y 3 recolectadas de perros en Cooperativa Lucha, y 2 muestras recolectadas en Cruce Dos Aguadas, de perro y de vaca.

A continuación, se presenta un ejemplo de la separación y visualización de los productos del PCR del gen *COI* en un gel de agarosa para 15 muestras, un control positivo y un control de reactivos (agua libre de nucleasas). En este gel se observa que la muestra CA016-1 (pozo 13) mostró un resultado negativo para el gen *COI* (Figura 2).

Figura 2: Gel de electroforesis de los productos de amplificación por PCR del gen *COI* de muestras de garrapatas recolectadas en la Reserva de la Biósfera Maya



Leyenda: Pozo 1: marcador molecular de 100 pb; pozo 2: control positivo; pozos 3 a 16: *pooles* de garrapatas; pozo 17: control de reactivos.

C. PCR y electroforesis del gen *hsp70* de *Leishmania spp.*

Para la amplificación del gen *hsp70*, se intentó optimizar la amplificación por PCR anidado, utilizando diferentes parámetros (Cuadro 3).

Entre estos se puede mencionar diferentes tiempos y ciclos de amplificación, diferentes temperaturas de anillamiento, uso de diferentes controles positivos, uso de reactivos nuevos, comparación entre *Taq* polimerasa y Platinum II *Taq* Hot-Start DNA Polymerase, e incluso la purificación de muestras, controles positivos y productos del primero de los PCR, previos al PCR anidado. Sin embargo, se observó que la mayoría de bandas de amplificación obtenidas mostraron barridos en el gel, o una concentración alta de material genético de alto peso molecular que no se separó en el gel de agarosa. Dada la falta de amplificación satisfactoria, se optó por cambiar el marcador molecular al gen de la subunidad pequeña de ARN ribosomal.

D. PCR y electroforesis del gen de la subunidad pequeña de ARN ribosomal (*SSU*) de *Leishmania spp.*

La prueba de amplificación del gen de la subunidad pequeña de ARN ribosomal (*SSU*) de *Leishmania spp.*, se realizó únicamente en las 37 muestras que mostraron amplificación para el gen *COI*, para evitar falsos negativos con las muestras que no amplificaron, o sea, asegurar que una falta de amplificación se debía a la ausencia de material genético del parásito y no a la falta

de viabilidad del mismo. Para el gen *SSU* se obtuvo una amplificación del 13.5% de las muestras de *pooles* de garrapatas (5/37). Se observó que todas las muestras que amplificaron corresponden a garrapatas identificadas morfológicamente como *Rhipicephalus microplus*, recolectadas en la localidad Cruce Dos Aguadas, en el municipio de San Andrés, Petén, durante los meses de septiembre y octubre del 2022 (ver Cuadro 5).

Cuadro 5: Resultados de la amplificación de los genes del citocromo oxidasa I (*COI*) y subunidad ribosomal pequeña de *Leishmania spp.* (*SSU*) en las muestras de garrapatas analizadas

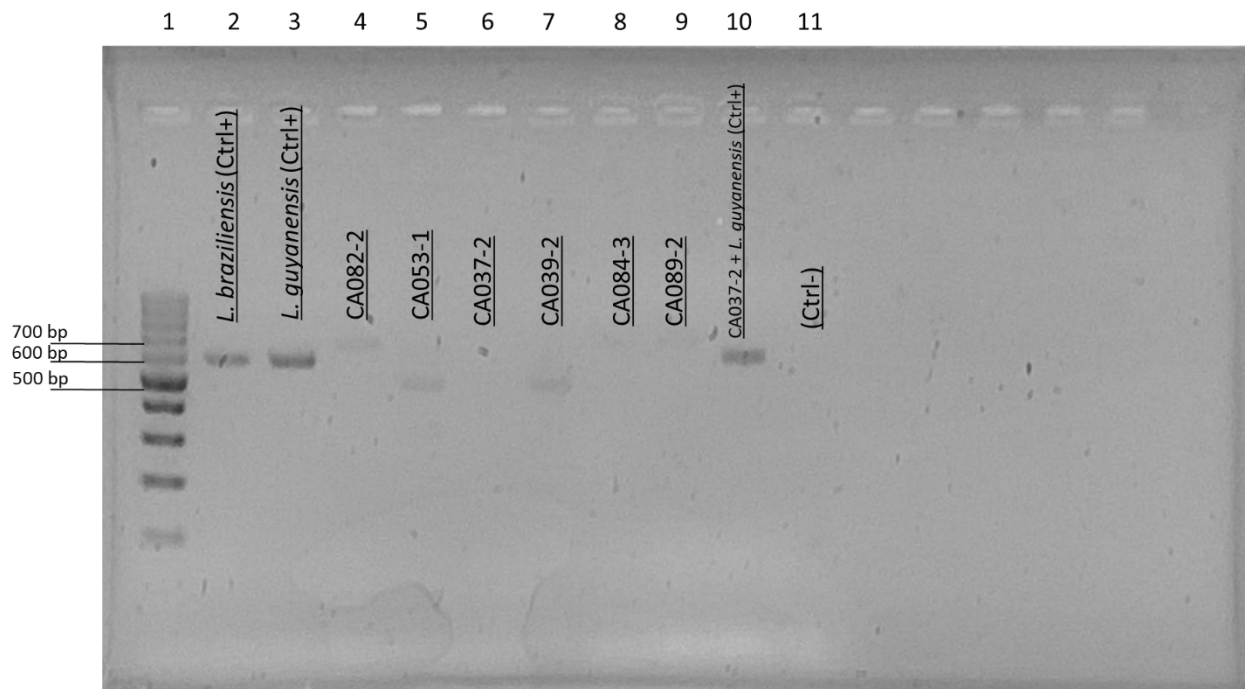
Muestra	Localidad	Origen de muestra	Especie	COI	SSU
LC012-2,3,9,10,15	Cooperativa Lucha	Vaca	<i>Rhipicephalus sp.</i>	+	-
UC052-10	Unión Maya Itzá	Vaca	<i>Rhipicephalus sp.</i>	+	-
UC053-5	Unión Maya Itzá	Vaca	<i>Rhipicephalus sp.</i>	+	-
UC055-5	Unión Maya Itzá	Vaca	<i>Rhipicephalus sp.</i>	+	-
LC018-1	Cooperativa Lucha	Perro	<i>Rhipicephalus sp.</i>	-	-
LC022-18,20,25,29,30	Cooperativa Lucha	Perro	<i>Rhipicephalus sp.</i>	+	-
LC022-4,5,10,14,15	Cooperativa Lucha	Perro	<i>Rhipicephalus sp.</i>	+	-
LC014-20	Cooperativa Lucha	Ambiente	<i>Rhipicephalus sp.</i>	-	-
LC014-21_25	Cooperativa Lucha	Ambiente	<i>Rhipicephalus sp.</i>	+	-
LC014-3,4,5,7,8	Cooperativa Lucha	Ambiente	<i>Rhipicephalus sp.</i>	+	-
LC014-9,10,11,12,19	Cooperativa Lucha	Ambiente	<i>Rhipicephalus sp.</i>	-	-
SDL006	Yaxhilán	Ambiente	<i>Rhipicephalus sp.</i>	+	-
LC008-5,25	Cooperativa Lucha	Cabra	<i>Rhipicephalus sp.</i>	+	-
UC049-21	Unión Maya Itzá	Cabra	<i>Rhipicephalus sp.</i>	+	-
CA003-1_2	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	-	-
CA019-1	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>Rhipicephalus sp.</i>	+	-
CA024-1	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	-
CA029-2	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	-
CA036-2	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	-
CA037-2	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	-
CA039-2	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	+
CA074-2	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	-
CA074-3	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	-
CA074-4	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	-
CA074-5	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	-
CA082-2	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	+
CA084-3	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	+
CA089-2	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	+
CA092-2	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	-
CA095-2	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	-
CA097-2	Cruce Dos Aguadas	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	-
CA016-1	Cruce Dos Aguadas	Perro	<i>Rhipicephalus sp.</i>	-	-
CA044-1	Cruce Dos Aguadas	Perro	<i>R. sanguineus</i>	+	-
CA053-1	Cruce Dos Aguadas	Perro	<i>R. microplus</i>	+	+
CA068-2	Cruce Dos Aguadas	Perro	<i>R. sanguineus</i>	+	-
CA078-2	Cruce Dos Aguadas	Perro	<i>R. sanguineus</i>	+	-
MM003-1	Poptún*	Perro	<i>Rhipicephalus sp.</i>	+	-
MM004-1	Dolores*	Persona	<i>Rhipicephalus sp.</i>	-	-

Muestra	Localidad	Origen de muestra	Especie	COI	SSU
LC049-3	Cooperativa Lucha	Vaca	<i>R. microplus</i>	+	-
LC059-3	Cooperativa Lucha	Perro	<i>R. sanguineus</i>	+	-
LC059-4	Cooperativa Lucha	Perro	<i>R. sanguineus</i>	-	-
LC060-2	Cooperativa Lucha	Perro	<i>R. sanguineus</i>	+	-
LC061-3	Cooperativa Lucha	Perro	<i>R. sanguineus</i>	+	-
LC061-4	Cooperativa Lucha	Perro	<i>R. sanguineus</i>	+	-
LC062-2	Cooperativa Lucha	Perro	<i>R. sanguineus</i>	-	-

*Sin dato de localidad. Únicamente de municipio.

A continuación, se presenta un gel de electroforesis con los productos del PCR del gen *SSU*. Se incluyen 6 muestras, un marcador molecular de 100 pb, dos controles positivos de *Leishmania* y un control de reactivos, en un gel de agarosa al 2% (Figura 3). Además, se incluyó un control positivo que consistió en ADN de garrapata con ADN de *Leishmania guyanensis*, como control de la confiabilidad del PCR.

Figura 3: Gel de electroforesis con los productos de amplificación por PCR del gen *SSU* de *Leishmania spp.* en muestras de garrapatas recolectadas en la Reserva de la Biósfera Maya



Leyenda: Pozo 1: Marcador molecular de 100pb; pozos 2 y 3: controles positivos; pozos 4 a 9: *pooles* de garrapatas; pozo 10: control de ADN de *Leishmania guyanensis* con ADN de garrapata (control de confiabilidad de PCR); pozo 11: control de reactivos.

En la Figura 3 se puede observar que las muestras CA082-2, CA084-3 y CA089-2 mostraron bandas tenues con un tamaño aproximado de 650-670 pb, mayor al de los productos de los controles positivos de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania guyanensis*. Las muestras CA084-

3 y CA089-2 mostraron bandas mucho más tenues y casi indetectables en comparación con las anteriores. Las muestras CA053-1 y CA039-2 mostraron bandas de aproximadamente 500-530 pb, un tamaño inferior al de las bandas de los controles de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania guyanensis*.

E. Análisis de datos

1. Análisis en BLAST

Se realizó un análisis *in silico*, alineando los *primers* del gen SSU con parásitos de la familia Trypanosomatidae, y determinando el tamaño de los posibles fragmentos de amplificación que se obtendrían. Se observó que los productos de PCR de las muestras CA082-2, CA084-3 y CA089-2 se acercan al tamaño esperado para este gen en *Trypanosoma sp.*, especialmente entre los fragmentos de 650 y 680 pb. Se observa que la secuencia del primer SSU561-F se alinea principalmente en este tamaño de banda (Figura 4a). De la misma manera, los productos de PCR de las muestras CA053-1 y CA039-2 se acercan al tamaño esperado de la secuencia de *Leishmania infantum*, especialmente las secuencias entre 490 y 520 pb. Se observa que la secuencia del primer SSU561-R se alinea principalmente en este tamaño de banda (Figura 4b). Cabe mencionar que el valor E de las secuencias de *Leishmania* en donde se alinean los *primers* es de 0.62 (Figura 4b), mientras que el valor E de las secuencias de *Trypanosoma* es de 38 (Figura 4a).

Figura 4: Análisis de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de productos esperados a partir de las secuencias de *primers* utilizados para el gen *SSU* de *Leishmania spp.*

a)

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100	?		
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma lewisi isolate R072 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma lewisi	36.2	36.2	100%	38	100.00%	322	OQ547237.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma lewisi isolate R049 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma lewisi	36.2	36.2	100%	38	100.00%	375	OQ547238.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma theileri isolate C12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma theileri	36.2	36.2	100%	38	100.00%	411	OR271995.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma shawi isolate VECAP1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma shawi	36.2	36.2	100%	38	100.00%	471	OR717151.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhynchomonas nasuta isolate Cape28_PD small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Rhynchomonas nasuta	36.2	36.2	100%	38	100.00%	493	OQ771612.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma sp. isolate Arpl18_SV small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma sp.	36.2	36.2	100%	38	100.00%	495	OQ771603.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma lewisi isolate R073 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma lewisi	36.2	36.2	100%	38	100.00%	533	OQ547236.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosomatidae sp. clone 15 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosomatidae sp.	36.2	36.2	100%	38	100.00%	568	OR371594.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosomatidae sp. clone 13 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosomatidae sp.	36.2	36.2	100%	38	100.00%	568	OR371592.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma sp. isolate DIE15 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma sp.	36.2	36.2	100%	38	100.00%	570	OR462730.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma sp. isolate DIE19 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma sp.	36.2	36.2	100%	38	100.00%	586	OR462731.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma sp. isolate BRCARR1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma sp.	36.2	36.2	100%	38	100.00%	614	OR711558.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma melophagium isolate WSE-68 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma melophagium	36.2	36.2	100%	38	100.00%	657	OR921417.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma melophagium isolate WSW-214 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma melophagium	36.2	36.2	100%	38	100.00%	666	OR921419.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma melophagium isolate KY-257 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma melophagium	36.2	36.2	100%	38	100.00%	673	OR921420.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma melophagium isolate GS-64 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma melophagium	36.2	36.2	100%	38	100.00%	674	OR921416.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma melophagium isolate KY-268 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma melophagium	36.2	36.2	100%	38	100.00%	675	OR921421.1
<input checked="" type="checkbox"/> Trypanosoma melophagium isolate WSE-161 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma melophagium	36.2	36.2	100%	38	100.00%	676	OR921418.1

b)

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100	?			
<input checked="" type="checkbox"/> select all	100 sequences selected	GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer				
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate P23D0D7D14 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	425	OR250382.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania braziliensis isolate Lb_sp1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania bra...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	443	OR656597.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate Li_sp6 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	494	OR656596.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate Dog23_bm small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	499	OR250397.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate Dog22 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	501	OR250395.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate BMVL8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	502	OR250370.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate Dog14 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	503	OR250393.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate Dog03 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	504	OR250390.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate LVHSE09 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	508	OR250364.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Crithidia sp. isolate LVHSE140 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Crithidia sp.	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	508	OR228492.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate Dog20 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	510	OR250394.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate P39 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	510	OR250384.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate LVHSE52 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	510	OR250368.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate LVHSE43 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	511	OR250367.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate BMVL17 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	512	OR250376.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Trypanosoma sp. isolate Lobr03_LB small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Trypanosoma sp.	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	512	OQ771619.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate Dog111 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	513	OR250400.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Leishmania infantum isolate LVHSE61 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Leishmania infa...	42.1	42.1	100%	0.62	100.00%	514	OR250372.1

a) Análisis de BLAST de la secuencia del primer SSU561-F, utilizado para la amplificación del gen *SSU*. b) Análisis de BLAST de la secuencia del primer SSU561-R, utilizado para la amplificación del gen *SSU*.

Se puede observar que la mayoría de las secuencias con las que se alinean los *primers* corresponden a secuencias del género *Leishmania* y *Trypanosoma*, ambos de la familia Trypanosomatidae. Cabe mencionar que el valor E de las secuencias de *Leishmania* es de 0.62 (Figura 4b), mientras que el valor E de las secuencias de *Trypanosoma* es de 38 (Figura 4a). También se observan otras secuencias, como una secuencia de *Crithidia sp.*, de la misma familia taxonómica Trypanosomatidae, con un valor E de 0.62. Además, se observa una secuencia de *Rhynchomonas nasuta*, con un valor E de 38. Este último, aunque no es de la familia Trypanosomatidae, comparte la misma clase taxonómica Kinetoplastea.

2. Tasa de amplificación o infección de garrapatas

Se calculó la tasa de positividad de las garrapatas a partir de los resultados de la amplificación por PCR, tanto del gen *COI* como del gen *SSU* de *Leishmania sp.* Se observó que las garrapatas tuvieron una tasa de positividad de 82.22% para el gen *COI*, mientras que de 13.51% para el gen *SSU* de *Leishmania sp.* (Cuadro 6).

Cuadro 6: Porcentaje de positividad de amplificación de los genes analizados en garrapatas

Gen	Positividad	Total	Porcentaje
<i>COI</i>	37	45	82.22%
<i>SSU</i>	5	37	13.51%

3. Prueba Chi cuadrado

Se realizó una prueba de Chi cuadrado (χ^2) para determinar una posible relación entre el hospedero y la localidad, y la positividad de los resultados. Se determinó que el valor de Chi cuadrado fue menor al valor crítico tanto para la localidad donde se recolectaron las garrapatas como el hospedero del cual se recolectaron, corroborando los resultados del valor p (Cuadro 7).

Cuadro 7: Resultados de prueba de Chi cuadrado

	<i>SSU de Leishmania spp.</i>		
	Chi cuadrado	Valor crítico	Valor p
Sitio	4.914	9.488	0.296
Origen de muestra	1.516	9.488	0.824

VIII. DISCUSIÓN

Este estudio es el primero en Guatemala en explorar la posible infección de parásitos de la familia Trypanosomatidae en garrapatas de la Reserva de la Biósfera Maya. Los resultados muestran amplificación positiva para una tasa de infección del 13.51%. Según se observa en la Figura 3, el tamaño de los fragmentos amplificados para el PCR de *SSU* de las muestras tiene un tamaño similar al de los controles positivos de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania guyanensis*. Sin embargo, para alguna de estas muestras los fragmentos amplificados son de mayor o menor tamaño. Al realizar un análisis *in silico* en BLAST, se pudo observar que el tamaño de los fragmentos que amplifican los *primers* utilizados pueden variar de acuerdo con la especie de *Leishmania* desde 400 pb hasta más de 600 pb (ver Figura 4b). Los reportes de especies de *Leishmania* encontradas en garrapatas han sido principalmente *Leishmania infantum* (Dantas-Torres, Martins, et al., 2010) y *Leishmania braziliensis* (Rojas-Jaimes et al., 2022). En Guatemala, la mayoría de infecciones de *Leishmania* descritas se deben a *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana* (Lopez et al., 2023). Sin embargo, se tienen indicios de otras especies de *Leishmania* presentes en el país, como *Leishmania panamensis* y *Leishmania guyanensis* (Ruiz Calderón, 2018). Asimismo, cabe resaltar que los controles positivos (*Leishmania braziliensis* y *Leishmania guyanensis*) pertenecen a especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* (Coughlan et al., 2018). Se ha observado que el gen *SSU* en *Leishmania* puede variar en tamaño, desde 301 pb (Pombi et al., 2020) hasta 882 pb (van Eys et al., 1992). Asimismo, en especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*, este gen tiene un tamaño que se mantiene en el rango entre 454 pb (Rogers et al., 2011) y 782 pb (Marcili et al., 2014). Por lo tanto, es posible que este sea un factor en la diferencia de tamaños de los fragmentos amplificados observados en el gel de electroforesis, en comparación con otras especies de *Leishmania*. Los resultados de BLAST y GenBank muestran que la alineación de los *primers* utilizados en la secuencia de *Leishmania infantum* genera fragmentos de aproximadamente 510 pb (Takamiya et al., 2023), mientras que, en especies como *Leishmania adleri*, la alineación de los *primers* genera fragmentos de aproximadamente 850 pb (Espinosa et al., 2018). Por lo tanto, se recomienda secuenciar estos productos de PCR para llegar a una mayor precisión de las posibles especies de *Leishmania* que se encuentren en las garrapatas. En este mismo análisis de BLAST (ver Figura 4), puede notarse que los *primers* utilizados en este estudio también pueden hibridarse de forma menos específica con parásitos de la familia Trypanosomatidae, como son *Trypanosoma sp.* De hecho, según la Figura 3, se observa que las bandas de mayor tamaño (muestras CA082-2, CA084-3 y CA089-2) tienen un tamaño cercano a 670 pb, lo cual es similar al fragmento *SSU* de *Trypanosoma sp.* y *Trypanosoma melophagium* (Figura 4a). Asimismo, las bandas de menor tamaño (muestras CA053-1 y CA039-1) tienen un tamaño cercano a 540 pb, lo cual se asemeja a regiones de *Trypanosoma sp.* y *Leishmania infantum* a los que se unen las secuencias de los *primers* utilizados (Figura 4b). Por lo tanto, no se puede descartar que las garrapatas recolectadas en la comunidad Cruce Dos Aguadas, San Andrés, Petén, podrían estar infectadas por algún tipo de parásito tripanosomátido, el cual puede pertenecer a *Leishmania sp.* o *Trypanosoma sp.*

La posible prevalencia de *Trypanosoma sp.* en las garrapatas no es infundada, puesto que ya se han reportado casos de *Trypanosoma sp.* en garrapatas en Latinoamérica. Por ejemplo, en

2017 se reportó en Brasil la infección de *Trypanosoma rhipicephalis* en garrapatas pertenecientes a la especie *Rhipicephalus microplus*, recolectadas de ganado bovino (Marotta et al., 2018). En este estudio se utilizó también el gen *SSU* para detectar al parásito en las garrapatas, de manera que puede ser probable que los resultados de este estudio hayan mostrado la presencia posible de *Trypanosoma* en las garrapatas recolectadas en la Reserva de la Biósfera Maya, Petén. Asimismo, otros estudios han reportado la presencia de *Trypanosoma* en otras especies de garrapatas, como *Trypanosoma caninum* en *Ixodes ricinus* (Luu et al., 2020), *Trypanosoma theileri* en *Hyalomma anatolicum* (Zeb et al., 2019) y *Trypanosoma pestanai*, también en *Ixodes ricinus* (Koual et al., 2023). El análisis de BLAST sugiere que pudo detectarse alguna infección en las garrapatas por un parásito de la familia Trypanosomatidae. Como se puede observar en la Figura 4, el valor E de las secuencias de *Leishmania* era de 0.62, mientras que el de las secuencias de *Trypanosoma* era de 38 (Figura 4). Esto implica que la probabilidad de que las secuencias de los *primers* se hayan alineado aleatoriamente a cualquier secuencia de *Trypanosoma*, en lugar de una región en específica es mucho mayor que en las secuencias de *Leishmania* (Sharon et al., 2005). Por lo tanto, las secuencias alineadas de *Leishmania* en el análisis de BLAST sugieren que las secuencias de los *primers* de la amplificación del gen *SSU* de *Leishmania* efectivamente pudieron haber amplificado *Leishmania spp.* en las muestras de garrapatas. Sin embargo, cabe mencionar que tanto las secuencias de *Leishmania* como las de *Trypanosoma* muestran una identidad percentil del 100% (Figura 4), indicando que las secuencias de los *primers* fácilmente se alinean en su totalidad con secuencias de ambos géneros (Newell et al., 2013). Ya sea que se trate del género *Trypanosoma* o del género *Leishmania*, la presencia de esta familia de parásitos en las garrapatas sugiere que estos podrían también infectar a los huéspedes de las garrapatas recolectadas, como el ganado bovino, perros domésticos, e incluso personas.

Como se puede observar en el Cuadro 6, el 17.78% de las muestras dieron un resultado negativo para el gen de *COI*, coincidiendo con comunidades de los municipios de Las Cruces y San Andrés, Petén. Así también la muestra de persona recolectada en Dolores también presentó un resultado negativo del gen *COI*. Esto puede deberse a una posible degradación del material genético durante el procesamiento y transporte de las garrapatas o durante el proceso de extracción, o bien a la presencia de interferentes del PCR en la muestra. Además, se ha reportado que ciertos *primers* utilizados para amplificar el gen *COI* han mostrado no ser muy eficientes durante pruebas de PCR convencional, en comparación con otros métodos de detección del gen (Lv et al., 2014). Sin embargo, se utilizaron estos *primers* ya que era con los que se contaba. No se analizó la presencia de ADN de *Leishmania sp.* en las muestras de garrapatas que no amplificaron para el gen *COI*, ya que, si el ADN hubiera estado degradado o si hubiera tenido interferentes, se corría el riesgo de reportar un resultado falso negativo para el gen *SSU*.

Como se puede observar en el Cuadro 5, las muestras que dieron un resultado positivo en la amplificación por PCR del gen *SSU* de *Leishmania sp.* corresponden todas a garrapatas recolectadas en la comunidad Cruce Dos Aguadas, en el municipio de San Andrés, Petén. Sin embargo, como se puede observar en el Cuadro 7, la prueba de Chi cuadrado mostró que no hay evidencia de una relación entre la comunidad en donde se recolectaron las muestras y su positividad. Sin embargo, hay que tomar en consideración que la positividad de las muestras consistió en la positividad de los *pooles* de garrapatas analizadas. El muestreo de las garrapatas se realizó por conveniencia, por lo que no se puede concluir que no exista la posibilidad de una

relación entre la infección en las garrapatas y el sitio de recolección. Por lo tanto, se recomienda recolectar y analizar un mayor número de muestras de garrapatas, recolectadas mediante un muestreo aleatorio, así como ampliar el área de estudio. Como se puede observar en el Cuadro 6, la tasa de infección de los *pooles* de garrapatas según el PCR del gen *SSU* fue del 13.51%. Aunque se procesaron *pooles* de garrapatas, los positivos consistían de una sola hembra adulta. Por lo tanto, la tasa de infección por *pool* se acerca a la tasa de infección por garrapata individual. Otros estudios han reportado una tasa de infección de *Leishmania spp.* del 22.9% (Campos & Costa, 2014) y del 15.4% (Coutinho et al., 2005). Por lo tanto, la tasa de infección reportada en este estudio se asemeja a las de estudios similares, aunque no puede todavía confirmarse si la infección se debe a parásitos del género *Leishmania*, *Trypanosoma* o ambos.

Dado que cuatro de las cinco muestras positivas para el gen *SSU* de *Rhipicephalus microplus* fueron recolectadas de ganado bovino, existe la posibilidad que las vacas de las que se alimentaron las garrapatas hayan estado infectadas con este parásito. También es probable que las garrapatas hayan adquirido el material genético de estos parásitos anteriormente, ya que se ha demostrado la transmisión de *Leishmania* por vía oral. En un estudio en el que se alimentó hámsteres con flebótomos infectados con *Leishmania infantum* y *Leishmania braziliensis*, así como con cultivos axénicos de *Leishmania*, los animales desarrollaron leishmaniasis (Reimann et al., 2022). Por lo tanto, no se descarta la posibilidad de una infección accidental de *Leishmania* por parte de los hospederos en donde se recolectaron las garrapatas. En caso que el material genético sea de parásitos del género *Trypanosoma*, el ganado bovino estaría en riesgo de tripanosomiasis, una enfermedad que puede provocar fiebre, parasitemia, letargo, y disminución de producción de leche (Osório et al., 2008). Si no se trata rápidamente, la infección puede producir incluso necrosis en la región afectada, la cual puede llegar incluso a ocasionar la muerte del animal (Wellde et al., 1989). Como consecuencia, esto puede llevar a pérdidas económicas muy grandes para los dueños del ganado bovino. En India, se estima que la pérdida anual por tripanosomiasis puede llegar hasta 671.1 millones de dólares estadounidenses (USD), o 44,740 millones de rupias indias (Kumar et al., 2017), y en Argentina, las pérdidas llegaron a 58,802 USD en el período 2016-2017, considerando abortos, muertes de vacas, gastos por tratamiento, entre otros (Abdala et al., 2020). Por otro lado, en caso la infección sea con parásitos del género *Leishmania*, implicaría que el ganado bovino, así como el perro de la otra muestra positiva, pudieron haber contraído al parásito causante de la leishmaniasis, y dependiendo de la especie, podrían constituir un riesgo para la población que vive en la cercanía de estos animales. Por ejemplo, en el sur de Irán se detectó ADN de *Leishmania infantum* y *Leishmania major* en ganado bovino (Rezaei et al., 2022). Si bien en este estudio no se reportaron síntomas en las vacas, la presencia de ADN de *Leishmania* sugiere que estos animales podrían ser potenciales reservorios, por lo que es necesario estudiar el comportamiento de los flebótomos con relación a estos animales para determinar si son un riesgo para seres humanos. La prevalencia de casos de leishmaniasis en el departamento de Petén (Lopez et al., 2023) también indica el riesgo de estos animales a padecer leishmaniasis (Lobsiger et al., 2010). Cabe mencionar que estos animales, especialmente los perros domésticos, son considerados hospederos centinelas, que son indicadores de que el parásito se encuentra en el área, siendo un potencial riesgo para las personas que se encuentren en el lugar (de Moraes et al., 2013). Un estudio en el suroeste de Irán mostró que la proximidad a establos de ganado podría ser un factor de riesgo para leishmaniasis cutánea en personas (Ghatee et al., 2018). Esto se debe a que la proximidad a estos animales aumenta la probabilidad de presencia de flebótomos, los principales vectores de

leishmaniasis (Alcover et al., 2014). Si, a través de secuenciación, se logra confirmar la presencia de alguna de las dos especies, sería el primer registro definitivo de *Trypanosoma* o *Leishmania* presente en garrapatas recolectadas en Guatemala. Es importante recalcar que la presencia de *Leishmania* o *Trypanosoma* en garrapatas no necesariamente implica que estos artrópodos tengan un rol como vectores del parásito, pero es necesario realizar más investigaciones para confirmar o descartar la presencia de tripanosomátidos en garrapatas por su importancia en la salud animal y humana (Dantas-Torres, 2011).

Es importante mencionar que la identificación de *Trypanosoma sp.* o *Leishmania sp.* como el parásito que infectó a las garrapatas no descarta la posibilidad de que ambos géneros de tripanosomátidos puedan encontrarse en las garrapatas o en sus hospederos. En países de Sudamérica, como Brasil y Venezuela, se han reportado casos de co-infección de *Trypanosoma* y *Leishmania*, especialmente en perros domésticos. El estudio de Venezuela reportó un caso de triple co-infección, de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* y *Leishmania chagasi* (Viettri et al., 2018). Estos estudios han reportado que la co-infección por estos tripanosomátidos puede estar relacionada a la cercanía de poblaciones rurales con los parásitos que naturalmente se encuentran en el ambiente. El estudio de Brasil reportó una co-infección natural de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* y *Leishmania sp.* en coatíes cercanos al asentamiento Urucum, cerca de la frontera con Bolivia, y una transmisión activa hacia los perros de este asentamiento (Porfirio et al., 2018). Asimismo, se han reportado casos de tripanosomiasis en regiones de Brasil donde prevalecen los casos de leishmaniasis, de manera que las dos enfermedades pueden ocurrir en la misma región (Barros et al., 2012). Por lo tanto, si a través de una secuenciación de los productos de PCR, se logra determinar ya sea *Trypanosoma sp.* o *Leishmania sp.* presente en las garrapatas recolectadas en Petén, Guatemala, no significa que se rechace la presencia del otro parásito en las comunidades estudiadas. El área de Petén Norte, donde se encuentra la comunidad Cruce Dos Aguadas, reportó en el 2021 46% de los casos de leishmaniasis del departamento (14% de los casos a nivel nacional) (SIGSA, 2022). Se recomienda realizar estudios tanto de la prevalencia de *Leishmania* como de *Trypanosoma* en las comunidades aledañas a la Reserva de la Biósfera Maya, así como en los animales y personas residentes de estas comunidades, y los ectoparásitos que puedan infestar a sus pobladores.

El estudio tuvo varias limitaciones. Las muestras analizadas de los *pooles* de garrapatas correspondían al género *Rhipicephalus*, al ser este uno de los géneros en donde se ha encontrado *Leishmania* (Coutinho et al., 2005). Sin embargo, también se ha reportado la presencia de *Leishmania* en otros géneros de garrapatas, como *Ixodes* (Magri et al., 2022) y *Amblyomma* (Rojas-Jaimes et al., 2022). El muestreo para este estudio fue por conveniencia, por lo que no es representativo de toda el área de estudio donde se recolectaron las garrapatas, por parte del equipo del proyecto Rickettsiosis GIZ. Por lo tanto, se recomienda realizar más estudios, con otras especies de garrapatas, y con una muestra más representativa de la Reserva de la Biósfera Maya, donde se recolectaron las muestras. Para poder validar los resultados de la amplificación del gen SSU de *Leishmania*, es necesario secuenciar los productos de PCR de esta amplificación en las muestras de *Rhipicephalus microplus*; este paso no se pudo realizar en el presente estudio por limitación de tiempo y recursos. Se recomienda secuenciar los productos de PCR para identificar si los tamaños de amplificación observados en el gel de electroforesis y las secuencias corresponden a *Leishmania*, o a algún otro género de la familia Trypanosomatidae.

Se intentó optimizar la amplificación del gen *hsp70* previo a la amplificación del gen *SSU*, debido a que este gen se encuentra conservado en el genoma de *Leishmania* (Folgueira et al., 2007), y ha sido utilizado para la detección del parásito de manera sistemática (Montalvo et al., 2017). Sin embargo, como se mostró en el Cuadro 3, se probaron diversos parámetros para optimizar la amplificación del gen *hsp70* y poder visualizar los resultados en un gel de electroforesis. Al final, no se logró amplificar el gen *hsp70* correctamente, observando barridos que pudieren deberse a la formación de productos no específicos de peso molecular alto. Dado que se variaron todas las condiciones del PCR y no se logró resolver el problema, es posible que la causa fuera una posible degradación de la solución stock de los *primers*, que fueron el único reactivo que se mantuvo constante en la mayoría de las pruebas de optimización (Kelleher & Champoux, 2000).

Este estudio es un primer acercamiento a la detección de parásitos como *Leishmania* en garrapatas recolectadas en comunidades de la Reserva de la Biósfera Maya, Petén, Guatemala. Según los resultados, se sospecha que las garrapatas pertenecientes a la especie *Rhipicephalus microplus* recolectadas podrían estar infectadas con tripanosomátidos como *Leishmania sp.* o *Trypanosoma sp.* Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos, no es posible afirmar que exista relación entre la especie de garrapata analizada y la infección por parásitos de la familia Trypanosomatidae.

IX. CONCLUSIONES

1. Se identificó la presencia de ADN de parásitos, posiblemente de la familia Trypanosomatidae, en *pooles* de garrapatas recolectadas en una comunidad de la Reserva de la Biósfera Maya en Petén, Guatemala.
2. No se encontró asociación entre la infección y el sitio de colecta o el hospedero del que se recolectaron las garrapatas.
3. La tasa de infección de garrapatas con posibles tripanosomátidos fue de 13.5%, la cual se asemeja a la tasa de infección de leishmaniasis de otros estudios.

X. RECOMENDACIONES

Se recomienda secuenciar los productos del PCR del SSU de las garrapatas analizadas en este estudio, para poder determinar con exactitud si están infectadas con algún tripanosomátido como *Trypanosoma* o *Leishmania*.

Se recomienda ampliar el tamaño de la muestra de garrapatas a analizar, utilizando garrapatas de otros géneros, además del género *Rhipicephalus*. Asimismo, se sugiere aumentar el número de garrapatas recolectadas en el área de estudio y recolectarlas mediante un método aleatorio para asegurar representatividad.

Se recomienda realizar reacciones de PCR anidado con el gen *SSU*, dado que esto permitiría aumentar el número de copias del material amplificado para tener mejor oportunidad de visualizar los productos por electroforesis en agarosa.

Para profundizar en los resultados obtenidos en las garrapatas, se recomienda realizar estudios de infección de las garrapatas en diferentes estadios de su ciclo de vida, así como en diferentes huéspedes, tanto infectados con leishmaniasis como no infectados. También se recomienda analizar la presencia de *Leishmania* (y otros parásitos de la familia Trypanosomatidae), en diferentes estructuras de las garrapatas, como el tracto gastrointestinal y los ovarios. Asimismo, se recomienda analizar la prevalencia de garrapatas en relación con flebotomos presentes en el área de estudio, para evaluar una posible tendencia de infecciones de leishmaniasis en los animales analizados.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdala, A. A., Larriestra, A. J., & Signorini, M. (2020). Estimación de pérdidas económicas causadas por *Trypanosoma vivax* en un rodeo lechero de Argentina. *Revista Veterinaria*, 31(2), 115–119. <https://doi.org/10.30972/vet.3124728>
- Abellan-Schneyder, I., Siebert, A., Hofmann, K., Wenning, M., & Neuhaus, K. (2021). Full-Length SSU rRNA Gene Sequencing Allows Species-Level Detection of Bacteria, Archaea, and Yeasts Present in Milk. *Microorganisms*, 9(6), 1251. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061251>
- Aguilar-Domínguez, M., Moo-Llanes, D. A., Sánchez-Montes, S., Becker, I., Feria-Arroyo, T. P., de León, A. P., & Romero-Salas, D. (2021). Potential distribution of *Amblyomma mixtum* (Koch, 1844) in climate change scenarios in the Americas. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(6), 101812. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101812>
- Aktas, M. (2014). A survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens. *Veterinary Parasitology*, 200(3–4), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.008>
- Alberts, B. (2015). *Molecular biology of the cell* (Sixth edition). Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Alcover, M. M., Ballart, C., Martín-Sánchez, J., Serra, T., Castillejo, S., Portús, M., & Gállego, M. (2014). Factors influencing the presence of sand flies in Majorca (Balearic Islands, Spain) with special reference to *Phlebotomus perniciosus*, vector of *Leishmania infantum*. *Parasites & Vectors*, 7(1), 421. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-421>
- Almazan, C., Aguilar Tipacamu, G., Rodriguez, S., Mosqueda, J., & Perez de Leon, A. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in Bioscience*, 23(8), 1535–1551. <https://doi.org/10.2741/4659>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Barros, J. H. S., Almeida, A. B. P. F., Figueiredo, F. B., Sousa, V. R. F., Fagundes, A., Pinto, A. G. S., Baptista, C., & Madeira, M. F. (2012). Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: What is the real impact of canine leishmaniasis control? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(7), 419–423. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.03.014>
- Becker, M., König, S., & Hoppe, B. (2021). A simple PCR-based approach for rapid detection of *Ips typographus* and *Ips duplicatus* in the presence of (associated) symbionts and parasites. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(2), 527–534. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00388-w>
- Bermúdez C., S., Domínguez A., L., Troyo, A., Montenegro H., V. M., & Venzal, J. M. (2022). Ticks infesting humans in Central America: A review of their relevance in public health. *Current*

Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases, 2, 100065.
<https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100065>

Boulanger, N., Boyer, P., Talagrand-Reboul, E., & Hansmann, Y. (2019). Ticks and tick-borne diseases. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 49(2), 87–97.
<https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.01.007>

Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet (London, England)*, 392(10151), 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)

Campos, J. H. F., & Costa, F. A. L. (2014). Participation of ticks in the infectious cycle of canine visceral leishmaniasis, in Teresina, Piauí, Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(4), 297–300. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000400005>

Cazan, C. D., Ionică, A. M., Matei, I. A., D’Amico, G., Muñoz, C., Berriatua, E., & Dumitrache, M. O. (2020). Detection of *Leishmania infantum* DNA and antibodies against *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* s.l. And *Ehrlichia canis* in a dog kennel in South-Central Romania. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 62(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-00540-4>

Charles, R. A., Bermúdez, S., Banović, P., Alvarez, D. O., Díaz-Sánchez, A. A., Corona-González, B., Etter, E. M. C., Rodríguez González, I., Ghafar, A., Jabbar, A., Moutailler, S., & Cabezas-Cruz, A. (2021). Ticks and Tick-Borne Diseases in Central America and the Caribbean: A One Health Perspective. *Pathogens*, 10(10), 1273. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101273>

Colombo, F. A., Odorizzi, R. M. F. N., Laurenti, M. D., Galati, E. A. B., Canavez, F., & Pereira-Chiocola, V. L. (2011). Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitology Research*, 109(2), 267–274. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2247-6>

Costa-da-Silva, A. C., Nascimento, D. de O., Ferreira, J. R. M., Guimarães-Pinto, K., Freire-de-Lima, L., Morrot, A., Decote-Ricardo, D., Filardy, A. A., & Freire-de-Lima, C. G. (2022). Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7040054>

Coughlan, S., Taylor, A. S., Feane, E., Sanders, M., Schonian, G., Cotton, J. A., & Downing, T. (2018). *Leishmania naiffi* and *Leishmania guyanensis* reference genomes highlight genome structure and gene evolution in the Viannia subgenus. *Royal Society Open Science*, 5(4), 172212. <https://doi.org/10.1098/rsos.172212>

Coutinho, M. T. Z., Bueno, L. L., Sterzik, A., Fujiwara, R. T., Botelho, J. R., De Maria, M., Genaro, O., & Linardi, P. M. (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 128(1–2), 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.011>

Dabaghmanesh, T., Asgari, Q., Moemenbellah-Fard, M. D., Soltani, A., & Azizi, K. (2016). Natural transovarial and transstadial transmission of *Leishmania infantum* by naïve *Rhipicephalus sanguineus* ticks blood feeding on an endemically infected dog in Shiraz, south of Iran. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(7), 408–413. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw041>

- Dantas-Torres, F. (2011). Ticks as vectors of Leishmania parasites. *Trends in Parasitology*, 27(4), 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.006>
- Dantas-Torres, F., Lorusso, V., Testini, G., de Paiva-Cavalcanti, M., Figueredo, L. A., Stanneck, D., Mencke, N., Brandão-Filho, S. P., Alves, L. C., & Otranto, D. (2010). Detection of Leishmania infantum in Rhipicephalus sanguineus ticks from Brazil and Italy. *Parasitology Research*, 106(4), 857–860. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1722-4>
- Dantas-Torres, F., Martins, T. F., Paiva-Cavalcanti, M. D., Figueredo, L. A., Lima, B. S., & Brandão-Filho, S. P. (2010). Transovarial passage of Leishmania infantum kDNA in artificially infected Rhipicephalus sanguineus. *Experimental Parasitology*, 125(2), 184–185. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.02.003>
- Day, M. J. (2011). One health: The importance of companion animal vector-borne diseases. *Parasites & Vectors*, 4(1), 49. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-49>
- de Moraes, R. C. S., Gonçalves, S. da C., Costa, P. L., da Silva, K. G., da Silva, F. J., Silva, R. P. E., de Brito, M. E. F., Brandão-Filho, S. P., Dantas-Torres, F., & de Paiva-Cavalcanti, M. (2013). Detection of Leishmania infantum in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. *Experimental & Applied Acarology*, 59(4), 473–481. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9611-4>
- Esch, K. J., & Petersen, C. A. (2013). Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 58–85. <https://doi.org/10.1128/cmr.00067-12>
- Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., & Shaw, J. J. (2018). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. *Parasitology*, 145(4), 430–442. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002092>
- FamilySearch Catalog. (n.d.). *550px-Petén_Departamento_Mapa.png (PNG Imagen, 550 × 455 píxeles)*. Retrieved February 4, 2024, from https://www.familysearch.org/es/wiki/img_auth.php/thumb/b/bc/Pet%C3%A9n_Departamento_Mapa.png/550px-Pet%C3%A9n_Departamento_Mapa.png
- Folgueira, C., Cañavate, C., Chicharro, C., & Requena, J. M. (2007). Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World Leishmania species. *Parasitology*, 134(Pt 3), 369–377. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001570>
- Folgueira Fernández, C. (2006). *Los genes HSP70 de Leishmania importancia de la regulación traduccional y relevancia biológica del gen HSP70-II* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad Autónoma de Madrid]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=2383>
- Ghatee, M. A., Haghdoost, A. A., Kooreshnia, F., Kanannejad, Z., Parisaie, Z., Karamian, M., & Moshfe, A. (2018). Role of environmental, climatic risk factors and livestock animals on the occurrence of cutaneous leishmaniasis in newly emerging focus in Iran. *Journal of Infection and Public Health*, 11(3), 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.12.004>

- Gou, H., Xue, H., Yin, H., Luo, J., & Sun, X. (2018). Molecular Characterization of Hard Ticks by Cytochrome c Oxidase Subunit 1 Sequences. *The Korean Journal of Parasitology*, *56*(6), 583–588. <https://doi.org/10.3347/kjp.2018.56.6.583>
- Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Peña, A., & Levin, M. (2013). Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *4*(3), 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.12.003>
- Ikeogu, N. M., Akaluka, G. N., Edechi, C. A., Salako, E. S., Onyilagha, C., Barazandeh, A. F., & Uzonna, J. E. (2020). Leishmania Immunity: Advancing Immunotherapy and Vaccine Development. *Microorganisms*, *8*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081201>
- Jahfari, S., Hofhuis, A., Fonville, M., Van Der Giessen, J., Van Pelt, W., & Sprong, H. (2016). Molecular Detection of Tick-Borne Pathogens in Humans with Tick Bites and Erythema Migrans, in the Netherlands. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *10*(10), e0005042. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005042>
- Karp, G., & Patton, J. G. (2013). *Cell and molecular biology: Concepts and experiments* (7th ed). John Wiley.
- Kelleher, C. D., & Champoux, J. J. (2000). RNA degradation and primer selection by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase contribute to the accuracy of plus strand initiation. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(17), 13061–13070. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.17.13061>
- Kim, H. K. (2022). Rickettsia-Host-Tick Interactions: Knowledge Advances and Gaps. *Infection and Immunity*, *90*(9), e00621-21. <https://doi.org/10.1128/iai.00621-21>
- Koual, R., Buysse, M., Grillet, J., Binetruy, F., Ouass, S., Sprong, H., Duhayon, M., Boulanger, N., Jourdain, F., Alafaci, A., Verdon, J., Verheyden, H., Rispe, C., Plantard, O., & Duron, O. (2023). Phylogenetic evidence for a clade of tick-associated trypanosomes. *Parasites & Vectors*, *16*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05622-y>
- Kumar, R., Jain, S., Kumar, S., Sethi, K., Kumar, S., & Tripathi, B. N. (2017). Impact estimation of animal trypanosomosis (surra) on livestock productivity in India using simulation model: Current and future perspective. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *10*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.06.008>
- Lobsiger, L., Müller, N., Schweizer, T., Frey, C. F., Wiederkehr, D., Zumkehr, B., & Gottstein, B. (2010). An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Veterinary Parasitology*, *169*(3–4), 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.022>
- Lopez, Y., Arana, B., Rizzo, N., Duran, E., Acosta-Serrano, Á., & Mendizabal-Cabrera, R. (2023). A neglected among the neglected: A review of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, trad024. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trad024>
- Low, V. L., Tay, S. T., Kho, K. L., Koh, F. X., Tan, T. K., Lim, Y. A. L., Ong, B. L., Panchadcharam, C., Norma-Rashid, Y., & Sofian-Azirun, M. (2015). Molecular characterisation of the tick *Rhipicephalus microplus* in Malaysia: New insights into the cryptic diversity and

distinct genetic assemblages throughout the world. *Parasites & Vectors*, 8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0956-5>

Luu, L., Bown, K. J., Palomar, A. M., Kazimírová, M., & Bell-Sakyi, L. (2020). Isolation and partial characterisation of a novel Trypanosoma from the tick Ixodes ricinus. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(5), 101501. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101501>

Lv, J., Wu, S., Zhang, Y., Chen, Y., Feng, C., Yuan, X., Jia, G., Deng, J., Wang, C., Wang, Q., Mei, L., & Lin, X. (2014). Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). *Parasites & Vectors*, 7, 93. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-93>

Maggi, R. G., & Krämer, F. (2019). A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasites & Vectors*, 12(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3407-x>

Magri, A., Caffara, M., Fioravanti, M., & Galuppi, R. (2022). Detection of Leishmania sp. kDNA in questing Ixodes ricinus (Acari, Ixodidae) from the Emilia-Romagna Region in northeastern Italy. *Parasitology Research*, 121(11), 3331–3336. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07655-9>

Marcili, A., Sperança, M. A., da Costa, A. P., Madeira, M. de F., Soares, H. S., Sanches, C. de O. C. C., Acosta, I. da C. L., Giroto, A., Minervino, A. H. H., Horta, M. C., Shaw, J. J., & Gennari, S. M. (2014). Phylogenetic relationships of Leishmania species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of Leishmania (L.) infantum chagasi in South America. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 25, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.001>

Marotta, C. R., Santos, P. N. D., Cordeiro, M. D., Matos, P. C. M., Barros, J. H. D. S., Madeira, M. D. F., Bell-Sakyi, L., & Fonseca, A. H. (2018). Trypanosoma rhipicephalis sp. nov. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae) ticks in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology Open*, 4, e2. <https://doi.org/10.1017/pao.2017.17>

Mendizábal-Cabrera, R., Pérez, I., Becerril Montekio, V., Pérez, F., Durán, E., & Trueba, M. L. (2021). Cutaneous leishmaniasis control in Alta Verapaz (northern Guatemala): Evaluating current efforts through stakeholders' experiences. *Infectious Diseases of Poverty*, 10(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s40249-021-00842-3>

Millán, J., Travaini, A., Zanet, S., López-Bao, J. V., Trisciuglio, A., Ferroglio, E., & Rodríguez, A. (2016). Detection of Leishmania DNA in wild foxes and associated ticks in Patagonia, Argentina, 2000 km south of its known distribution area. *Parasites & Vectors*, 9, 241. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1515-4>

Montalvo, A. M., Fraga, J., Tirado, D., Blandón, G., Alba, A., Van Der Auwera, G., Vélez, I. D., & Muskus, C. (2017). Detection and identification of Leishmania spp.: Application of two hsp70-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World. *Parasitology Research*, 116(7), 1843–1848. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5454-6>

- Moo-Millan, J. I., Hernández-Andrade, A., May-Concha, I. J., Montalvo-Balam, T. de J., Arnal, A., Talavera-Escalante, M. J., Amblard-Rambert, A., Martínez-Vega, P. P., Ramos-Ligonio, Á., Ibarra-Cerdeña, C. N., Hernández-Betancourt, S., & Waleckx, E. (2023). Temporal variation of *Triatoma dimidiata* abundance and infection with *Trypanosoma cruzi* in domestic and sylvatic habitats of rural Yucatan, Mexico. *Acta Tropica*, 248, 107038. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.107038>
- Nelson, D. L., Cox, M. M., & Lehninger, A. L. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (Seventh edition). W.H. Freeman and Company ; Macmillan Higher Education.
- Newell, P. D., Fricker, A. D., Roco, C. A., Chandrangsu, P., & Merkel, S. M. (2013). A Small-Group Activity Introducing the Use and Interpretation of BLAST †. *Journal of Microbiology & Biology Education : JMBE*, 14(2), 238–243. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v14i2.637>
- Nuttall, P. A. (2019). Wonders of tick saliva. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(2), 470–481. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.005>
- Nyangiwe, N., Yawa, M., & Muchenje, V. (2018). Driving forces for changes in geographic range of cattle ticks (Acari: Ixodidae) in Africa: A review. *South African Journal of Animal Science*, 48(5), 829. <https://doi.org/10.4314/sajas.v48i5.4>
- Osório, A. L. A. R., Madruga, C. R., Desquesnes, M., Soares, C. O., Ribeiro, L. R. R., & Costa, S. C. G. da. (2008). *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax*: Its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World--a review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762008000100001>
- Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *The Journal of Infection*, 69 Suppl 1, S10-18. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>
- Paternina-Gómez, M., Díaz-Olmos, Y., Paternina, L. E., & Bejarano, E. E. (2013). High prevalence of infection with *Leishmania* (*Kinetoplastea*: *Trypanosomatidae*) in dogs in northern Colombia. *Biomédica*, 33(3), Article 3. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i3.780>
- Pombi, M., Giacomi, A., Barlozzari, G., Mendoza-Roldan, J., Macrì, G., Otranto, D., & Gabrielli, S. (2020). Molecular detection of *Leishmania* (*Sauroleishmania*) *tarentolae* in human blood and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in *Sergentomyia minuta*: Unexpected host-parasite contacts. *Medical and Veterinary Entomology*, 34(4), 470–475. <https://doi.org/10.1111/mve.12464>
- Porfirio, G. E. de O., Santos, F. M., de Macedo, G. C., Barreto, W. T. G., Campos, J. B. V., Meyers, A. C., André, M. R., Perles, L., de Oliveira, C. E., Xavier, S. C. das C., Andrade, G. B. de, Jansen, A. M., & Herrera, H. M. (2018). Maintenance of *Trypanosoma cruzi*, *T. evansi* and *Leishmania* spp. By domestic dogs and wild mammals in a rural settlement in Brazil-Bolivian border. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 7(3), 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.10.004>
- Rakhshanpour, A., Malmasi, A., Mohebbali, M., Nabian, S., Mirhendi, H., Zarei, Z., Dalimi, A., Mohammadiha, A., Akhoundi, B., & Azarm, A. (2017). Transmission of *Leishmania infantum* by *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Dogs. *Iranian Journal of Parasitology*, 12(4), 482–489.

- Reimann, M. M., Torres-Santos, E. C., Souza, C. S. F. de, Andrade-Neto, V. V., Jansen, A. M., Brazil, R. P., & Roque, A. L. R. (2022). Oral and Intra-gastric: New Routes of Infection by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum*? *Pathogens*, *11*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/pathogens11060688>
- Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet. Infectious Diseases*, *7*(9), 581–596. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)
- Ren, L., Chen, W., Shang, Y., Meng, F., Zha, L., Wang, Y., & Guo, Y. (2018). The Application of COI Gene for Species Identification of Forensically Important Muscid Flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, *55*(5), 1150–1159. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy076>
- Rezaei, Z., Pourabbas, B., Asaei, S., Sepehrpour, S., Ahmadnia Motlagh, S., Pourabbas, P., Abdolahi Khasibi, S., & Alborzi, A. (2022). Livestock infected with *Leishmania* spp. in southern Iran. *Parasites & Vectors*, *15*(1), 215. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05313-8>
- Rogers, M. B., Hilley, J. D., Dickens, N. J., Wilkes, J., Bates, P. A., Depledge, D. P., Harris, D., Her, Y., Herzyk, P., Imamura, H., Otto, T. D., Sanders, M., Seeger, K., Dujardin, J.-C., Berriman, M., Smith, D. F., Hertz-Fowler, C., & Mottram, J. C. (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Research*, *21*(12), 2129–2142. <https://doi.org/10.1101/gr.122945.111>
- Rojas-Jaimes, J., Correa-Núñez, G. H., Donayre, L., & Lescano, A. G. (2022). Quantitative Detection of *Leishmania* in *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma sabanerae* in the Peruvian Amazon Basin. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, *7*(11), 358. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7110358>
- Rueda-Concha, K. L., Payares-Mercado, A., Guerra-Castillo, J., Melendrez, J., Arroyo-Munive, Y., Martínez-Abad, L., Cochero, S., Bejarano, E. E., & Paternina, L. E. (2022). Circulación de *Leishmania infantum* y *Trypanosoma cruzi* en perros domésticos de áreas urbanas de Sincelejo, región Caribe de Colombia. *Biomédica*, *42*(4), 633–649. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6369>
- Ruiz Calderón, C. J. (2018). *Epidemiología molecular de la Leishmaniosis cutánea en Guatemala durante el período 1980-2017 por medio del método PCR-RFLP/hsp70*. Universidad del Valle de Guatemala.
- Sant'Anna, M. R. V., Jones, N. G., Hindley, J. A., Mendes-Sousa, A. F., Dillon, R. J., Cavalcante, R. R., Alexander, B., & Bates, P. A. (2008). Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Tropica*, *107*(3), 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.003>
- Sharon, I., Birkland, A., Chang, K., El-Yaniv, R., & Yona, G. (2005). Correcting BLAST e-values for low-complexity segments. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology*, *12*(7), 980–1003. <https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.980>
- SIGSA. (2022). *Reporte nominal de casos de morbilidad por Leishmaniasis, año 2021*. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

- Silatsa, B. A., Kuate, J.-R., Njiokou, F., Simo, G., Feussom, J.-M. K., Tunrayo, A., Amzati, G. S., Bett, B., Bishop, R., Githaka, N., Opiyo, S. O., Djikeng, A., & Pelle, R. (2019). A countrywide molecular survey leads to a seminal identification of the invasive cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Cameroon, a decade after it was reported in Cote d'Ivoire. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *10*(3), 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.002>
- Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J. C., Diaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J. D., Junge, K., Engel, J., & Sindermann, H. (2004). Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *38*(9), 1266–1272. <https://doi.org/10.1086/383321>
- Takamiya, N. T., Rogerio, L. A., Torres, C., Leonel, J. A. F., Vioti, G., de Sousa Oliveira, T. M. F., Valeriano, K. C., Porcino, G. N., de Miranda Santos, I. K. F., Costa, C. H. N., Costa, D. L., Ferreira, T. S., Gurgel-Gonçalves, R., da Silva, J. S., Teixeira, F. R., De Almeida, R. P., Ribeiro, J. M. C., & Maruyama, S. R. (2023). Parasite Detection in Visceral Leishmaniasis Samples by Dye-Based qPCR Using New Gene Targets of *Leishmania infantum* and *Crithidia*. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, *8*(8), 405. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8080405>
- Van der Auwera, G., Ravel, C., Verweij, J. J., Bart, A., Schönian, G., & Felger, I. (2014). Evaluation of four single-locus markers for *Leishmania* species discrimination by sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(4), 1098–1104. <https://doi.org/10.1128/JCM.02936-13>
- van Eys, G. J., Schoone, G. J., Kroon, N. C., & Ebeling, S. B. (1992). Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *51*(1), 133–142. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90208-2](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90208-2)
- Viettri, M., Herrera, L., Aguilar, C. M., Morocoima, A., Reyes, J., Lares, M., Lozano-Arias, D., García-Alzate, R., Chacón, T., Feliciangeli, M. D., & Ferrer, E. (2018). Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania* spp. Coinfection in domestic, peridomestic and wild mammals of Venezuelan co-endemic areas. *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports*, *14*, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.10.002>
- Viol, M. A., Guerrero, F. D., de Oliveira, B. C. M., de Aquino, M. C. C., Loiola, S. H., de Melo, G. D., de Souza Gomes, A. H., Kanamura, C. T., Garcia, M. V., Andreotti, R., de Lima, V. M. F., & Bresciani, K. D. S. (2016). Identification of *Leishmania* spp. Promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. *Parasitology Research*, *115*(9), 3479–3484. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5111-5>
- Wellde, B. T., Reardon, M. J., Kovatch, R. M., Chumo, D. A., Williams, J. S., Boyce, W. L., Hockmeyer, W. T., & Wykoff, D. E. (1989). Experimental infection of cattle with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, *83 Suppl 1*, 133–150. <https://doi.org/10.1080/00034983.1989.11812418>
- Zeb, J., Szekeres, S., Takács, N., Kontschán, J., Shams, S., Ayaz, S., & Hornok, S. (2019). Genetic diversity, piroplasms and trypanosomes in *Rhipicephalus microplus* and *Hyalomma anatolicum* collected from cattle in northern Pakistan. *Experimental & Applied Acarology*, *79*(2), 233–243. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00418-9>

XII. ANEXOS

Anexo 1: Carta de aprobación del Comité de Ética del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala para la recolección de las garrapatas, utilizadas para este estudio.



Comité de Ética, para el Uso y Cuidado Animal de la
Universidad del Valle de Guatemala
CEUCA - UVG

Investigador Principal: David Morán
Edificio y oficina: Centro de Estudios en Salud
E-Mail: dmoran@ces.uvg.edu.gt
Teléfono: (502) 40223793
Número de propuesta: I – 2022 (1)

Guatemala, 6 de abril de 2022

Estimado investigador,

Por este medio se hace constar que la propuesta de investigación titulada: *Rickettsiosis en comunidades humanas y animales de la Selva Maya Guatemalteca: una exploración a sus determinantes antropogénicas y ecológicas*, ha sido evaluada por miembros del comité de Ética, para el Uso y Cuidado Animal de la Universidad Del Valle de Guatemala (CEUCA – UVG).

Se ha realizado una revisión del protocolo con el fin de asegurar el cuidado y uso ético a los animales que serán utilizados para cumplir con los propósitos de la investigación. Se ha determinado que se cumple con los requisitos necesarios, así como también se ha cumplido con los procedimientos y lineamientos descritos por el comité.

Por este medio se le informa que se autoriza realizar las prácticas con animales tal y como se describen en el protocolo final sometido al CEUCA UVG, por un periodo de un año a partir de la fecha de la presente carta. Se enfatiza la necesidad de iniciar el muestreo con animales silvestres, luego de obtener las licencias de autorización del CONAP como lo indica la normativa nacional.


Se le solicita que, si hubiese necesidad de hacer cualquier otra modificación a lo descrito en la propuesta, se comunique de nuevo con el comité para que dichas enmiendas sean evaluadas de manera que se pueda garantizar que se cumple a cabalidad con los lineamientos del CEUCA-UVG. Asimismo, rogamos que, al finalizar su trabajo de investigación, se comparta con el comité los resultados o publicaciones derivadas de la investigación.

Sin otro particular quedo a sus órdenes,



MV Vanessa Granados B
Médico Veterinario
Colegiado 997
CEUCA - UVG
Comité de Ética, Uso y Cuidado Animal
Universidad del Valle de Guatemala.

Anexo 2: Procedimientos normados de operación elaborados durante el desarrollo de esta investigación.

<p>Instituto de Investigaciones Centro de Estudios en Salud</p> <p>Laboratorio II2-304</p> 	<p>Procedimiento Normado de Operación</p>	<p>PNO: Versión: 1 Fecha: 29-11-2023</p>
	<p>Amplificación del gen SSU de <i>Leishmania</i> sp. en ADN de garrapatas por PCR</p>	<p>Páginas Totales: 3</p> <p>Autorizado: Renata Mendizábal Preparado por: Miguel Ángel Véliz</p>

1. **Propósito:** Amplificar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa el gen SSU de *Leishmania* sp. Con el fin de detectar *Leishmania* sp. en muestras de ADN de garrapatas recolectadas en la Reserva de la Biósfera Maya, mediante secuenciación de ADN.

2. **Aplicación:** Diagnóstica e investigación.

3. **Referencias:**

- Fraga, J., A. M. Montalvo, S. De Doncker, J.-C. Dujardin, and G. Van der Auwera. 2010. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 10: 238–245. doi:10.1016/j.meegid.2009.11.007.
- Montalvo, A. M., J. Fraga, D. Tirado, G. Blandón, A. Alba, G. Van Der Auwera, I. D. Vélez, and C. Muskus. 2017. Detection and identification of *Leishmania* spp.: application of two hsp70-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World. *Parasitology Research* 116: 1843–1848. doi:10.1007/s00436-017-5454-6.
- Ruiz Calderón, C. J. 2018. Epidemiología molecular de la Leishmaniosis cutánea en Guatemala durante el período 1980-2017 por medio del método PCR-RFLP/hsp70. Universidad del Valle de Guatemala.
- Van der Auwera, G., C. Ravel, J. J. Verweij, A. Bart, G. Schönian, and I. Felger. 2014. Evaluation of four single-locus markers for *Leishmania* species discrimination by sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 52: 1098–1104. doi:10.1128/JCM.02936-13.

Terminología y abreviaciones:


- mL: mililitros
- µl: microlitros
- mM: milimolar
- µM: micromolar
- min.: Minutos
- seg.: Segundos
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- NFW: agua libre de nucleasas
- ddH₂O: agua destilada
- °C: Grados centígrados
- (v/v): Porcentaje volumen/volumen

4. **Principio:** amplificación enzimática de un fragmento de ADN que es flanqueado por dos cebadores de oligonucleótidos (primers) que se hibridizan con las hebras opuestas en la secuencia blanco.


5. **Documentos asociados:** N/A

6. **Seguridad:**

- 6.1. Utilice guantes para evitar la contaminación de las muestras.

<p style="text-align: center;">Instituto de Investigaciones Centro de Estudios en Salud</p> <p style="text-align: center;">Laboratorio II2-304</p> 	<p>Procedimiento Normado de Operación</p>	<p>PNO: Versión: 1 Fecha: 29-11-2023</p>
	<p>Amplificación del gen <i>SSU</i> de <i>Leishmania</i> sp. en ADN de garrapatas por PCR</p>	<p>Páginas Totales: 3</p> <p>Autorizado: Renata Mendizábal Preparado por: Miguel Ángel Véliz</p>

- 6.2. Desinfectar el área de trabajo previo a comenzar
- 6.3. Agregar el ADN en un área diferente a donde se haya preparado el master mix.
- 6.4. Revisar el manual del termociclador antes de su uso.
- 6.5. Trabajar siempre en frío.
7. Equipos, materiales y reactivos:
- 7.1. Microtubos de 1.5 mL estériles
 - 7.2. Microtubos de 0.5 mL estériles
 - 7.3. Microtubos de 0.2 mL estériles
 - 7.4. Micro pipeta de 0.5 a 10 µl
 - 7.5. Micro pipeta de 20 a 200 µl
 - 7.6. Micro pipeta de 100 a 1000 µl
 - 7.7. Puntas de 0 a 15 µl estériles
 - 7.8. Puntas de 10 a 250 µl estériles
 - 7.9. Puntas de 100 a 1000 µl estériles
 - 7.10. Marcador Permanente
 - 7.11. Descarte de puntas
 - 7.12. Etanol al 70% (v/v)
 - 7.13. Solución de trabajo 10µM Primers de *SSU*:
 - 7.13.1. *SSU561-F* (5'-GGACGCCGGCACGATTKCT-3')
 - 7.13.2. *SSU561-R* (5'-CGAAGAAGTCCGATACGAGGGA-3');
 - 7.14. NFW H₂O
 - 7.15. Gradilla para microtubos
 - 7.16. Muestras de ADN extraído de garrapatas recolectadas de la Reserva de la Biósfera Maya
 - 7.17. Control Positivo
 - 7.17.1. *L. braziliensis*
 - 7.17.2. *L. guyanensis*
8. Procedimiento:
- 8.1. Seleccione los pools de ADN de garrapata que va a amplificar.
 - 8.2. Esterilice la campana Tipo II limpiándola con etanol al 70% (v/v) y dejándola por 15 min con luz UV.
 - 8.3. Coloque los reactivos para el master mix en un tubo de 1.5ml según la receta en los cuadros mostrados a continuación. El volumen total se multiplica por la cantidad de muestras de ADN más dos adicionales por posibles pérdidas de volumen, por cada uno de los reactivos que necesita para la mezcla de reacción (máximo 16)

Instituto de Investigaciones Centro de Estudios en Salud Laboratorio II2-304 	Procedimiento Normado de Operación	PNO: Versión: 1 Fecha: 29-11-2023
	Amplificación del gen <i>SSU</i> de <i>Leishmania</i> sp. en ADN de garrapatas por PCR	Páginas Totales: 3 Autorizado: Renata Mendizábal Preparado por: Miguel Ángel Véliz

REACTIVO	[stock]	[final]	Volumen (µL)
NFW H2O (µl)	-	-	0.50
Hot Start Master Mix	2X	1X	12.50
Primer F25	10 µM	0.8 µM	2.00
Primer R1310	10 µM	0.8 µM	2.00
Enhancer GC	5X	1X	5.00
ADN	-	-	3.00
Sub Total			25

8.4. Es necesario colocar un control negativo y control positivo para cada amplificación.

- Positivos de Citocromo C de garrapata (control de amplificación)
- Positivos de ADN de *Leishmania*
- Negativo

8.5. Distribuir la cantidad en microtubos de 0.2 µl según la cantidad de reacciones que se haya preparado.

8.6. Agregue 2µl del ADN extraído en cada microtubo previamente rotulado en la campana Tipo Gabinete.

8.7. Agregue 2µl de ddH₂O a cada control negativo de PCR, 2µl del control positivo.

8.8. Sellar el termociclador y correr el programa que se muestra en las tablas a continuación.

Etapa	Temperatura x tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94 °C x 4 min	1
Amplificación	94°C x 45 seg 61°C x 60 seg 68 °C x 30 seg	35
Extensión	68 °C x 5 min	1

8.9. Almacene de nuevo las muestras y reactivos de PCR a -20 °C

8.10. Limpie el área de trabajo que utilizó con etanol al 70%(v/v) y deje la campana 15 min con luz UV.

8.11. Una vez el termociclador haya terminado, remueva los tubos y almacene a 4°C.

9. Control de calidad:

9.1. Asegurarse que los tubos estén correctamente rotulados y la información esté correctamente agregada al formulario correspondiente.

10. Reporte de datos y documentos utilizados:

10.1. Cualquier tipo de manipulación y proceso que lleven las muestras debe llevar el código de la muestra.

10.2. Los procesos a los que se someten cada muestra deben estar registrados en el cuaderno de laboratorio.

10.3. Se llevan a cabo informes frecuentemente donde se registra la presencia de un producto de PCR correspondiente a cada muestra. Esta información se presenta al final de la investigación en un documento tipo Tesis.