



# Aislamiento e identificación de *Leishmania* sp de *Amblyomma naponense* y *Amblyomma humerale* colectadas de *Pecari tajacu*, *Tayassu pecari* y *Chelonoide denticulata*

Isolation and identification of *Leishmania* sp of *Amblyomma naponense* and *Amblyomma humerale* collected from *Pecari tajacu*, *Tayassu pecari* and *Chelonoide denticulata*

Jesús Rojas-Jaimes <sup>1,2,\*</sup>; Daniel Zarate-Rendon <sup>3</sup>; Gino Montoya-Arauco <sup>4</sup>

1 Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Privada del Norte, Lima, Perú.

2 Escuela de Medicina Humana, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.

3 Laboratorio de Parasitología, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

4 Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.

\*Autor corresponsal: [jesus.rojas.jaimes@gmail.com](mailto:jesus.rojas.jaimes@gmail.com) (J. Rojas-Jaimes).

ID ORCID de los autores

J. Rojas-Jaimes:  <https://orcid.org/0000-0002-6910-9341>

D. Zarate-Rendon:  <https://orcid.org/0000-0003-3532-8084>

G. Montoya-Arauco:  <https://orcid.org/0000-0003-1986-4557>

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue aislar e identificar a *Leishmania* de *Amblyomma naponense* y *Amblyomma humerale* colectadas de *Pecari tajacu*, *Tayassu pecari* y *Chelonoide denticulata*. Se colectaron garrapatas *Amblyomma naponense* y *Amblyomma humerale* de *Pecari tajacu*, *Tayassu pecari* y *Chelonoide denticulata* in Madre de Dios, Perú. Se extrajeron las vísceras y glándulas salivales de las garrapatas y se hicieron observaciones directas al microscopio, se realizaron cultivos en agar sangre bifásico y se inocularon en almohadillas plantares e intraperitoneal de hámsteres. En ninguna de las observaciones, cultivos y respuesta a las inoculaciones se aisló ni identificó al parásito. Estos resultados muestran una investigación básica la cual sirve para recomendar el uso de un número mayor de garrapatas colectadas de varios animales como potenciales reservorios de *Leishmania* y el uso de técnica de alta sensibilidad de detección del parásito como la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

**Palabras clave:** *Leishmania*; garrapata; aislamiento; reservorio; vector.

## ABSTRACT

The aim of this study was to isolate and identify *Leishmania* from *Amblyomma naponense* and *Amblyomma humerale* collected from *Pecari tajacu*, *Tayassu pecari* and *Chelonoides denticulata*. *Amblyomma naponense* and *Amblyomma humerale* ticks were collected from *Pecari tajacu*, *Tayassu pecari* and *Chelonoides denticulata* in Madre de Dios, Peru. The viscera and salivary glands of the ticks were extracted, and direct observations were made under the microscope. Samples were cultured in biphasic blood agar and inoculated into the footpads and intraperitoneal of hamsters. In none of the observations, cultures and responses to inoculations was the parasite isolated or identified. These results show basic research which serves to recommend the use of a larger number of ticks collected from various animals as potential reservoirs of *Leishmania* and the use of a highly sensitive parasite detection technique such as polymerase chain reaction (PCR).

**Keywords:** *Leishmania*; tick; isolation; reservoir; vector.

Recibido: 20-04-2022.

Aceptado: 24-07-2022.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por el protozoario *Leishmania* sp, entre las que figuran las especies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis* entre las más prevalentes en zonas endémicas como Perú y Brasil (Veland et al., 2011; Couto et al., 2014). La enfermedad es transmitida por un díptero llamado *Lutzomyia* sp, el cual presenta un amplio polimorfismo entre la forma cutánea, mucosa y visceral (Savoia, 2015).

En las Américas se considera a *Lutzomyia* sp como el vector involucrado en la transmisión del parásito *Leishmania* sp, aunque también se ha propuesto como transmisores a garrapatas, donde se ha identificado tanto ADN como ARN del protozoo, lo que indicaría la presencia y viabilidad del parásito en estos artrópodos (Colombo et al., 2011; Solano-

Gallego et al., 2012; Dantas-Torres, 2009).

En este sentido, Rojas-Jaimes et al. (2017) colectaron garrapatas de las especies *Amblyomma naponense* y *Rhipicephalus microplus* en *Tapirus terrestris* y *Pecari tajacu*, respectivamente, detectando ADN de *Leishmania* sp en *Rhipicephalus microplus* en la región de Madre de Dios. Marotta et al. (2018) reportaron en *Tayassu pecari* en Brasil garrapatas de la especie *Amblyomma brasiliensis*, pudiendo aislar un nuevo tripanosoma llamado *Trypanosoma amblyommi*.

Por lo tanto, el objetivo del estudio fue determinar la presencia de *Leishmania* en *Amblyomma naponense* y *Amblyomma humerale* colectados de *Pecari tajacu*, *Tayassu pecari* y *Chelonoide denticulata* en la región de Madre de Dios, Perú.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Colecta de Garrapatas

Se coordinó con los cazadores de los distritos de Planchon "Botijón", Iberia e Iñapari (distrito de Bélgica) en Madre de Dios, Perú, para la recolección de garrapatas en los animales que hayan sido cazados. Los pobladores de las comunidades nativas realizan la cacería de estos animales para autoconsumo.

Se colectaron 29 garrapatas de *Pecari tajacu* en el distrito de Bélgica, 30 de *Tayassu pecari* y 10 de *Chelonoide denticulata* en el lapso de dos semanas. Las garrapatas fueron transportadas vivas al laboratorio de parasitología de la Universidad Agraria la Molina de la escuela de Zootecnia, en frascos herméticos estériles, al laboratorio para la clasificación taxonómica y la extracción de vísceras. La clasificación taxonómica se basó en las claves de Barros-Battesti et al. (2006).

Por otro lado, y en forma casual, se colectó una garrapata del brazo de uno de los cazadores del poblado de Botijón. Se retiró todo resto de suciedad de las garrapatas con papel toalla y fueron colocadas en placas Petri conteniendo 5 a 10 gotas de una solución de suero fisiológico, antibiótico y antimicótico. Trabajando en el estereoscopio, se diseccionaron las garrapatas con ayuda de microestiletos entomológicos para exponer sus órganos internos. En el caso de las teleoginas más grandes fue necesario realizar un piquete previo a la apertura le extremo posterior del parásito.

### 2.2 Inoculación en hámsteres

Las garrapatas se agruparon en pooles por especie y animal de colecta. Se extrajeron las glándulas salivales y segmentos intestinales usando el estereoscopio Nikon SMZ 800N, material que fue colocados en tubos Vacutainer® conteniendo suero fisiológico más antibiótico y antimicótico. En un tubo de ensayo de 4 ml se colocaron las vísceras y glándulas salivales de las 28 garrapatas colectados de *Pecari tajacu*, las cuáles una vez homogenizadas

se distribuyeron en tubos de 2 ml. Asimismo, se procedió en forma similar con las vísceras y glándulas salivales de las 30 garrapatas colectados de *Tayassu pecari* y las 10 garrapatas colectadas de *Chelonoide denticulata*.

Un tubo ensayo de cada par de pooles se utilizó en la inoculación a hámsteres dorados hembras *Mesocricetus auratus* (0,5 ml en cada pata). El contenido del segundo tubo de ensayo de cada par fue usado para la inoculación intraperitoneal (0,5 ml), cultivo en medio bifásico (1 ml) y microscopía (0,5 ml).

### 2.3 Observación microscópica y cultivo

Las muestras para microscopía se colocaron en laminas portaobjetos y teñidas con Giemsa para la identificación de tripanosomatídeos usando un microscopio Nikon ECLIPSE Ei. Las láminas fueron observadas a 400X y 1000X. Se realizaron cultivos de agar sangre bifásico utilizando cloruro de sodio isotónico al 0,9% con penicilina 10 mil U/estreptomomicina 10 mg/ml y sangre desfibrinada de conejo. De cada muestra se hicieron tres cultivos (repeticiones). Las muestras fueron incubadas a 25 °C por 4 semanas, realizándose observaciones dos veces por semana.

### 2.4 Observación histológica

Los hámsteres tenían un mes de edad y fueron acondicionados en jaulas individuales con ventilación natural y cama de viruta en el bioterio de parasitología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Científica del Sur. En los hámsteres inoculados se evaluó el desarrollo de la enfermedad durante seis meses, de lunes a viernes, excepto sábados y domingos. Al final del sexto mes se tomaron muestras de biopsias a nivel hepático, pulmón, riñón y bazo de 1 cm<sup>2</sup>, aproximadamente, para fijarlos en formol y hacer láminas para los estudios histopatológicos a través de coloración

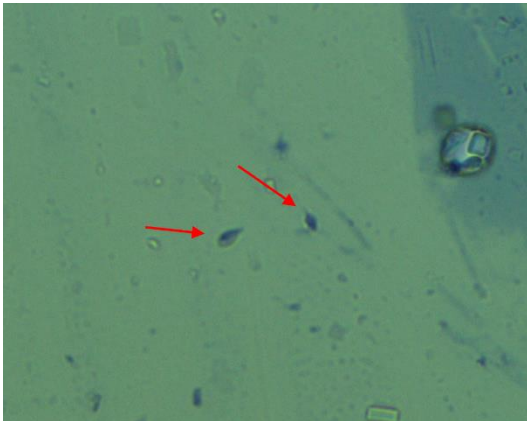
Hematoxilina/Eosina. En forma paralela, se utilizó un hámster como control positivo basado en la inoculación de una solución de  $2,34 \times 10^6$ /ml de *Leishmania* (cepa JM) en cultivo Schneider y como control negativo se utilizó un hámster inoculado

con una solución isotónica de cloruro de sodio al 0,9%. En ambos casos, se inoculó 0,5 ml en las almohadillas de las patas traseras y delanteras (2 ml total) y 0,5 ml vía intraperitoneal.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las garrapatas colectadas de *T. pecari* (30 machos) y *P. tajacu* (28 machos) fueron clasificadas como *Amblyomma naponense* y las colectadas de *C. denticulata* (10 machos) se clasificaron como *A. humerale*.

En ninguna de las muestras observadas mediante microscopio óptico del pool de glándulas salivales y segmentos intestinales de las garrapatas se observaron tripanosomátidos excepto en la garrapata colectada accidentalmente de una persona en la que se encontraron tripanosomátidos en forma flagelada del pool de glándulas salivales y segmentos intestinales (Figura 1).

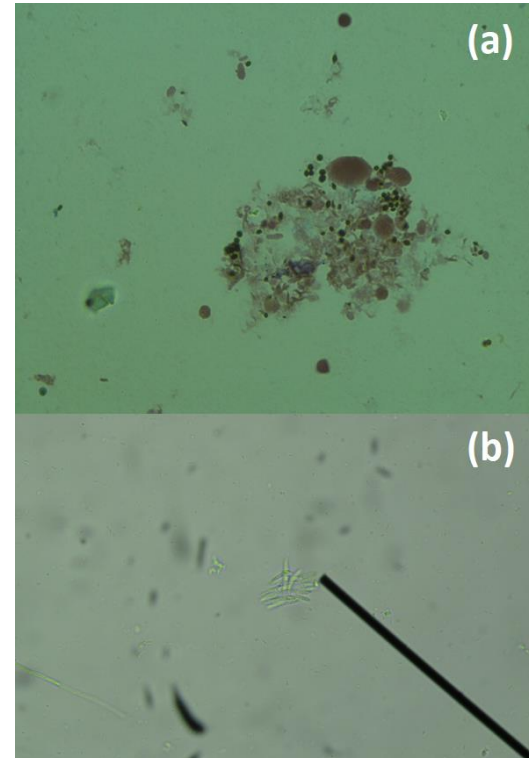


**Figura 1.** Coloración Giemsa de un extendido con vista directa al microscopio de la garrapata *A. naponense* colectada de una persona en el poblado de Botijon/Las Piedras visto a 400X donde se observa algunos flagelados.

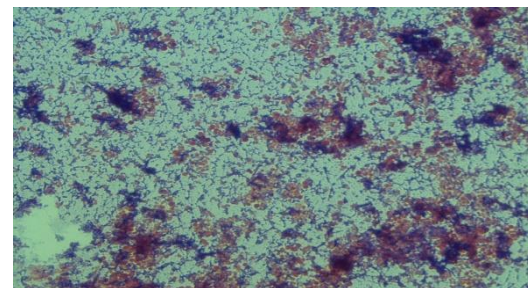
Los cultivos fueron negativos para el crecimiento de algún tripanosomátido flagelado, aunque se encontró un hongo *Fusarium* y levaduras en la muestra de *A. naponense* colectado de *Pecari tajacu* (Figuras 2 y 3).

En los cortes histopatológicos de las muestras provenientes de tejido hepático y bazo de los hámsteres retados con la cepa JM de promastigotes de *Leishmania* sp mostraron edema sinuoso de leve infiltrado inflamatorio linfocitario distribuido en todo el parénquima y reacción inflamatoria, tipo pavimentoso concordante con *Leishmaniasis* respectivamente. Las evaluaciones de las demás muestras histológicas no fueron concluyentes.

Las garrapatas colectadas de *T. pecari* y *P. tajacu* fueron clasificadas como *A. naponense* y las colectadas de *C. denticulata* como *A. humerale*. Estudios previos han demostrado la distribución especies del género *Amblyomma* en animales silvestres como en *Tapirus terrestres* y *C. denticulata* de la selva de Madre de Dios en Perú (Del Valle et al., 2018; Esser et al., 2016; Rojas-Jaimes et al., 2021).



**Figura 2.** (a) observación directa a 400X de vísceras y glándulas salivales de *A. naponense* colectado de *P. tajacu* donde se observa levaduras. (b) cultivo vísceras y glándulas salivales de *A. naponense* colectados de *P. tajacu* vistas al microscopio a 400X donde se observa *Fusarium* sp.



**Figura 3.** Observación directa a 400X de cultivo de hígado de hámster retado con vísceras y glándulas salivales de *A. naponense* colectado de *P. tajacu* donde se observa levaduras.

En el presente estudio no se logró aislar *Leishmania* en cultivo de intestinos y glándulas salivales de las garrapatas ni se pudo identificar en la presencia del parásito en los hámsteres retados con los inóculos de los tejidos de las garrapatas, con excepción del control positivo con la cepa JM de *Leishmania*. No obstante, Campos et al. (2014) lograron causar infección por *Leishmania* en hámsteres inoculados con extractos de garrapatas *Rhipicephalus*

*sanguineus* colectadas de perros. Si bien en el presente estudio no se identificó a *Leishmania* en *A. naponensis* y *A. humerale*, Araúz et al. (2016)

identificaron la forma de promastigote de *Leishmania* en glándulas salivales e intestinos de *R. sanguineus*.

### CONCLUSIONES

No se logró aislar a *Leishmania* por cultivo, microscopía directa ni histología, así como mediante el desarrollo de leishmaniasis en hámsteres inoculados con extractos de vísceras y glándulas salivales de *Amblyomma naponense* colectados de *Tayassu pecari* y *Pecari tajacu* y *A. humerale* colectados de *Chelonoide denticulata*.

Estos resultados muestran una investigación básica la cual sirve para recomendar el uso de un número mayor de garrapatas colectadas de varios animales como potenciales reservorios de *Leishmania* y el uso de técnica de alta sensibilidad de detección del parásito como la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

### AGRADECIMIENTOS

A la bióloga Jenny Chirinos Saire y al grupo de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de

Salud por el apoyo en la lectura de las láminas histológicas.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araúz, M., Guerrero, F., Miranda de Oliveira, B., Costa de Aquino, M., Hudson, S., Dias de Melo, G., Gomez, A., Takami, C., Garcia, M., Andreotti, R., Félix de Lima, V. & Saraiva, K. (2016). Identification of *Leishmania* spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of *Rhipicephalus sanguineus* actively infesting dogs. *Parasitology Research*, 115, 3479–3484.
- Barros-Battesti, D., Arzua, M., & Bechara, H. (2006). Carrapatos de Importância Medico-Veterinaria da Região Neotropical: Um Guia Ilustrado para Identificação de Espécies. 10ma edição. Sao Paulo: *Butantan Publicação*. p. 223.
- Campos, J., & Costa, F. (2014). Participation of ticks in the infectious cycle of canine visceral leishmaniasis, in Teresina, Piauí, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 56(4), 297-300.
- Colombo, F. A., Odorizzi, R. M., Laurenti, M. D., Galati, E. A., Canavez, F., & Pereira-Chioccola, V. L. (2011). Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) infantum RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitology Research*, 109, 267–274.
- Couto, D. V., Hans Filho, G., Medeiros, M. Z., Vicari, C. F. S., Barbosa, A. B., & Takita, L. C. (2014). American tegumentary leishmaniasis—a case of therapeutic challenge. *An Bras Dermatol*, 89, 974–976.
- Dantas-Torres, F. (2009). Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors*, 2(Suppl.1), 1-8.
- Del Valle-Mendoza, J., Rojas-Jaimes, J., Vasquez-Achaya, F., Aguilar-Luis, M. A., Correa-Nunez, G., Silva-Caso, W., & et al. (2018). Molecular identification of *Bartonella bacilliformis* in ticks collected from two species of wild mammals in Madre de Dios: Peru. *BMC Res Notes*, 11, 405.
- Esser, H., Foley, J., Bongers, F., Herre, E., Miller, M., Prins, H., & Jansen, P. (2016). Host body size and the diversity of tick assemblages on Neotropical vertebrates. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(3), 295-304.
- Marotta, C., Dos Santos, P., Cordeiro, M., Da S. Barros, J., Bell-Sakyi, L., & Fonseca, A. (2018). *Trypanosoma amblyommi* sp. nov. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) ticks in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol Open*, 4, e2.
- Rojas-Jaimes, J., Correa-Núñez, G., Rojas-Palomino, N., & Cáceres-Rey, O. (2017). Detección de *Leishmania* (*V. guyanensis*) en ejemplares de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: *Ixodidae*) recolectados en pecarías de collar (*Pecari tajacu*). *Biomédica*, 37(Supl.2), 208-214.
- Rojas-Jaimes, J., Lindo-Seminario, D., Correa-Núñez, G., & Benoit, D. (2021). Characterization of the bacterial microbiome of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* collected from *Pecari tajacu* "Sajino" Madre de Dios, Peru. *Scientific Reports*, 11, 6661.
- Savoia, D. (2015). Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*, 9, 588–596.
- Solano-Gallego, L., Rossi, L., Scroccaro, A., Montarsi, F., Caldin, M., Furlanello, T. & et al. (2012). Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*, 5, 98.
- Veland, N., Espinosa, D., Valencia, B., Ramos, A., Calderon, F., Arevalo, J., & et al. (2011). Polymerase chain reaction detection of leishmania kDNA from the urine of peruvian patients with cutaneous. *Am J Trop Med Hyg*, 84(4), 556-561.