

---

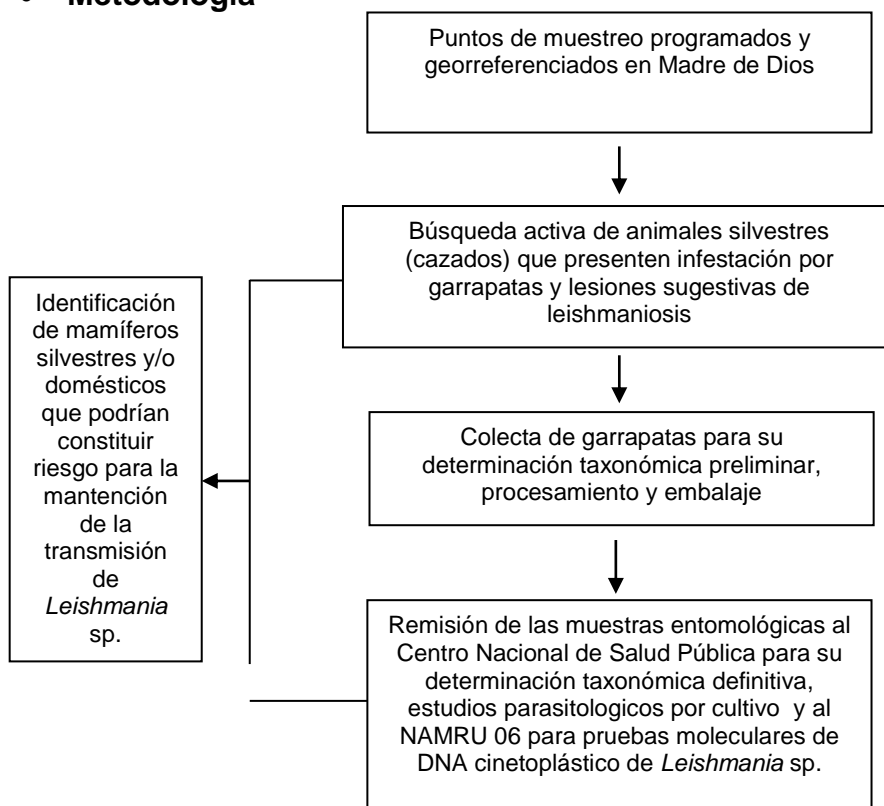
## LAS GARRAPATAS SILVESTRES COMO POTENCIALES RESERVORIOS DE *Leishmania* sp. EN LA PROVINCIA DE TAHUAMANU, REGION MADRE DE DIOS, 2012

- **Introducción**

Se ha reportado la ocurrencia de insectos vectores (*Lutzomyia* sp.) con bajas tasas de infección por *Leishmania* sp. así como transmisión autóctona en perros en ausencia del vector natural en perros. Estos datos, no esperados, sugieren la hipótesis de que habría otros artrópodos en la ruta de transmisión de la *Leishmania* sp. Es así que se ha encontrado una tasa del 50% de infección por *Leishmania* sp. en garrapatas de perros con leishmaniosis visceral canina con parásitos viables (en base al RNA del hemoparásito), quedando por dilucidar si estas garrapatas pueden actuar como vectores para leishmaniosis visceral canina a pesar de tener tasas de infección más altas que las previamente descritas para *Lutzomyia longipalpis* (1). Se ha sugerido que en la garrapata oscura del perro *Rhipicephalus sanguineus* ocurre transmisión transovárica de *Leishmania infantum* habiéndose reportado DNA del cinetoplasto de *Leishmania infantum* en hembras grávidas, sus huevos y larvas emergentes, estando pendiente la identificación de promastigotes del hemoparásito en larvas (2). En tal sentido, la hipótesis de *Rhipicephalus sanguineus* como un vector de *Leishmania infantum* ha sido un tema de debate en reuniones científicas, más aún ante la rápida extensión de la leishmaniosis canina en áreas previamente libres de la enfermedad y la potencial evidencia de modos no tradicionales de transmisión (3). Los perros constituyen un factor de riesgo importante al poder presentar coinfección por *Rickettsia* sp. y *Leishmania* sp., patógenos asociados a garrapatas en ambientes urbanos donde la serología y la PCR usadas en paralelo permitieron identificar infección por *Leishmania infantum* en perros jóvenes (4). Además, se ha reportado DNA del cinetoplasto de *Leishmania infantum*

en glándulas salivales de *Rhipicepalus sanguineus* tanto en Italia como en Brasil por lo que se hace necesario evaluar la competencia de las garrapatas como vectores de *Leishmania* de perro a perro (5). Aún cuando muchos patógenos transmitidos por vectores infectando gatos y perros en Italia pueden también ser una amenaza para la salud humana por cumplir un rol clave en el ciclo zoonótico de transmisión de algunos patógenos como *Bartonella henselae* y *Leishmania infantum* (6). De otro lado, en Sudamérica la leishmaniosis canina está bien extendida habiéndose identificado *Leishmania infantum* y *Leishmania braziliensis*, y como vector comprobado a *Lutzomyia longipalpis*, habiéndose diseminado la infección de ambientes rurales a ambientes silvestres (7) lo que sugiere la potencial participación de otros artrópodos en la transmisión del hemoparásito.

- **Metodología**



## **Cultivo de muestras en solución salina**

### **a) Preparación de solución salina**

a.1) Estreptomicina de 5gr se disolvió en 10ml de agua destilada estéril, y se congelo(-20), para preparar de esta solución tomamos 0.2ml para 100ml de solución salina fisiológica estéril esta se mantuvo en refrigeración hasta el muestreo

a.2) La penicilina de 1'000, 000, se disolvió en 5ml de agua destilada estéril, y se congelo; de esta solución tomamos 0.5ml para 100ml de solución salina fisiológica estéril y la mantuvimos en refrigeración.

a.3) Las muestras fueron tomadas con pinzas, se colocó en la solución salina con antibióticos y se mantuvo en refrigeración hasta el proceso de cultivo.

## **b) Preparación del medio de cultivo**

### b.1) Solución fisiológica 0.85%

- ClNa.....0.85 g
- Agua destilada..... 100 mL

Diluir y autoclavar.

### b.2) Solución stock de antibióticos

- Sulfato de estreptomicina.....0.5 g
- Penicilina sódica.....0.5 g
- Agua destilada.....10 mL

Pesar los reactivos, diluir y filtrar con membrana Millipore N° 0.22 um.

Usar 1 mL de la solución para 100 mL de solución salina.

### b.3) Medio de cultivo AGAR SANGRE (Walton et al., 1977)

- Agar sangre Difco código B45.....4 g
- Agua destilada.....100 mL
- Solución stock de antibióticos.....1 mL
- Sangre desfibrinada de conejo.....15 mL

La sangre obtenida por punción cardiaca, fue vertida en un matraz o balón estéril, el

cual, contuvo perlas de vidrio. Para desfibrinar la sangre, se agita suavemente con

movimientos rotatorios, durante 10 minutos. Se separo 15 mL en una probeta estéril.

Preparación:

- Se diluyo el agar y se autoclo a 121°C por 20 minutos.

-Se dejó enfriar a temperatura ambiente; cuando alcanzó los 56°C aproximadamente,

se agrego los 15 mL de sangre desfibrinada y 1 mL de la solución stock de antibióticos.

- Se homogenizo y se repartio aproximadamente 1 mL del medio en tubos de cultivo

de 13 x 100 con tapa de rosca.

- Se colocó los tubos en plano inclinado y se dejó al medio ambiente por 2 horas.

-Se controló en estufa de 37°C por 24 horas.

-Se conservó los tubos en refrigeración (4°C) hasta el momento de su uso.

### **c) Inoculación del cultivo**

c.1) Se tomó una muestra con una pipeta estéril de cada muestra procesada que en total fueron catorce y se colocó en los tubos con medio de cultivo previamente preparados.

c.2) Se mantuvo en la estufa a por 2 semanas observándolos en forma diaria excepto los sábados y domingos.



**Foto 1.-Medios de cultivo**



**Foto 2., Incoculación de las muestras de garrapatas en los medios de cultivo**

### **Protocolo de biología molecular**

a) Purificación del ADN de las muestras de garrapatas utilizando Gentra Puregene (QIAGEN)

a.1) Ponga las garrapatas en un tobogán, y cortar en 4 a 6 piezas.

a.2) Póngalos en un tubo de 1,5 ml.

a.3) Añadir el otro 300 uL de solución de lisis celular en el tubo, añadir 1.5uL, 5 ul o 20 ul de proteinasa K (dependiendo del tamaño de la garrapata), y mezclar suavemente con el vórtex, centrifugar si es necesario.

a.4). Incubar el tubo a 55 ° C durante la noche.

a.5) Añadir 100uL de la solución de proteína precipitación y agitar vigorosamente durante 20 años.

a.6) Centrifugar durante 10 min a 13000 rpm.

a.7) Añadir 300ul de frío iso propanol en un tubo de centrífuga de 1,5 ml limpio y añadir el sobrenadante de la etapa anterior mediante el vertido. No se les caiga la proteína de pellets.

a.8) Mezclar suavemente por inversión 50 veces.

a.9) Centrifugar durante 10 min a 13000rpm, y el lugar en el congelador durante 1 hora.

a.10) Desechar el sobrenadante con cuidado y vaciar el tubo por inversión en un pedazo de papel en blanco.

- a.11) Deje secar al aire durante 5 minutos
- a.12) Añadir 60uL de solución de ADN hidratación y agitar 5s a velocidad media.
- a.13) Incubar 65 ° C durante 1 hora para disolver el ADN.

b) Primers usados

b•1) Primers (SIGMA)

-MP1-L (sentido) 5'-TAC TCC TGC CCG ACA CTC TG-3 '

-MP3-H (antisentido) 5 'CGG GGT GAA TTC TGT ATG C-3'

b•2) DNA conjunto de control

-Leishmania (V.) braziliensis cepa MHOM/BR/84/LTB300

-Humano del ADN a partir de muestras negativas para la leishmaniasis

c) Control de calidad

Para cada reacción de PCR, debe haber por lo menos un control positivo para *Leishmania (V) braziliensis* (cepa LTB300) o de otra especie de *Leishmania* del complejo *Viannia*; un control negativo que consiste en ADN humano negativo para *Leishmania*, y un espacio en blanco (agua destilada, PCR grado) para revelar la contaminación cruzada.

Condiciones del termociclaje

En un termociclador GeneAmp ® PCR System 9700 los programas siguientes:

c.1) Desnaturalización inicial: 94oC durante 5 minutos

c.2) 35 Ciclos incluyendo:

Desnaturalización: 94oC durante 45 segundos

Primers de recocido: 58oC durante 45 segundos

Extensión: 72oC durante 1 minuto

c.3) Final de extensión: 72oC durante 5 minutos

c.4) Refrigeración: 4 ° C ∞ para

En el bloque de calentamiento de termociclador, poner una placa de muestra de plástico y los tubos de 0,2 ml.

Cubrir con la tapa calentada y ejecutar la reacción. Este ensayo tarda aproximadamente 1:15 horas.

d) Interpretación

El tamaño del producto esperado es de 70 pb. Un resultado positivo se indica por la presencia de una banda en esta posición cuando se compara con el control positivo y la escalera 50 pb de ADN.

## Resultados

Fotos representativas de animales capturados para extraer las garrapatas



Foto 3.-*Tapirus terrestris*





**Foto 4.-*Tayassu tajacu***

**Ficha de registro de muestras**

<b>Forma de colecta</b>	<b>Lugar</b>	<b>Origen de la muestra</b>	<b>Inicio del muestreo</b>	<b>Término del muestreo</b>
Manual (recolección directa)	Sabaluyoc (distrito de Las Piedras, provincia Tambopata, región Madre de Dios	Humano (por impregnación directa)	02 de junio 2012	03 de junio 2012
Muestra en: alcohol				
Número de especímenes: 10				

<b>Forma de colecta</b>	<b>Lugar</b>	<b>Origen de la muestra</b>	<b>Inicio del muestreo</b>	<b>Término del muestreo</b>
-------------------------	--------------	-----------------------------	----------------------------	-----------------------------

Manual (recolección directa)	San Lorenzo (distrito de Tahuamanu, provincia Tahuamanu, región Madre de Dios	Animal (tres sachavacas cazadas)	09 de junio 2012	10 de junio 2012
Muestra en: alcohol				
Número de especímenes: 136				

<b>Forma de colecta</b>	<b>Lugar</b>	<b>Origen de la muestra</b>	<b>Inicio del muestreo</b>	<b>Término del muestreo</b>
Manual (recolección directa)	Botijón (distrito de Las Piedras, provincia Tambopata, región Madre de Dios	Animal (tres sajinos cazados)	16 de junio 2012	17 de junio 2012
Muestra en: suero fisiológico/Número de especímenes: 93				
Muestra en: alcohol/Número de especímenes: 75				

<b>Forma de colecta</b>	<b>Lugar</b>	<b>Origen de la muestra</b>	<b>Inicio del muestreo</b>	<b>Término del muestreo</b>
Manual (recolección directa)	Bajo Alegría (distrito de Las Piedras, provincia Tambopata, región Madre de Dios	Humano (por impregnación directa)	23 de junio 2012	24 de junio 2012
Muestra en: alcohol				

Número de especímenes: 46

**Consolidado de muestras:**

Medio de transporte	Origen animal	Origen humano	Subtotal
En suero fisiológico	93	-	93
En alcohol	136 + 75	10 + 46	267
Total general:	304	56	360

**Fotos en escala de garrapatas capturadas**



Foto 5.-Garrapatas a escala con la regla



Foto 6.-Garrapatas a mayor escala con la regla

#### CLASIFICACION TAXONOMICA PRELIMINAR

Tabla 1.-Garrapatas clasificadas taxonómicamente en Madre de Dios 2012

# de orden rotulación	Procedencia	Huésped	cantidad de garrapatas	Estadio	Especies
1	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>
2	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>
3	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>
4	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>
5	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>
6	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>
7	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>
8	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>
9	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>

10	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
11	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma naponense</i>
12	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma naponense</i>
13	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma naponense</i>
14	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma naponense</i>
15	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma naponense</i>
16	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>
17	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>
18	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>
19	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
20	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
21	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
22	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
23	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma latepunctatum</i>
24	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma latepunctatum</i>
25	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma latepunctatum</i>
26	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
27	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
28	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma latepunctatum</i>
29	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma ovale</i>
32	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
33	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
35	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
36	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
37	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
38	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
39	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
40	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
41	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
42	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
43	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
44	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
45	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
46	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
47	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
48	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
49	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
50	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
51	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
52	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
53	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
54	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
55	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
56	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
57	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
58	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>

59	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
60	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
61	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
62	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
63	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
64	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
65	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
66	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
67	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
68	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
69	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
70	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
71	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
72	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
73	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
74	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
75	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
76	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
77	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
78	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
79	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
80	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
81	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
82	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
83	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
84	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
85	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
86	Botijón	Sajino	1	ninfa	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
87	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
88	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
89	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
90	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
91	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
92	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
93	Botijón	Sajino	1	ninfa	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
94	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
95	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>

96	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
97	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
98	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
99	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
100	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
101	Botijón	Sajino	1	ninfa	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
102	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
103	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
104	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
105	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
106	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
107	Botijón	Sajino	1	ninfa	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
108	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
109	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
110	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
111	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma ovale</i>
112	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
113	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
114	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma ovale</i>
115	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
116	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
117	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
118	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
119	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
120	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
121	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
122	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
123	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
124	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
125	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
126	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma ovale</i>
127	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma coelebs</i>
128	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>
129	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma ovale</i>
130	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
131	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
132	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
133	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
134	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
135	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
136	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>

137	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
138	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
139	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
140	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma latepunctatum</i>
141	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma latepunctatum</i>
142	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma latepunctatum</i>
143	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
144	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
145	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
146	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
147	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
148	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
149	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma latepunctatum</i>
150	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
151	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma coelebs</i>
152	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
153	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
154	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
155	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma coelebs</i>
156	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
157	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
158	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
159	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
160	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma latepunctatum</i>
161	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
162	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma naponense</i>
163	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma latepunctatum</i>
164	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
165	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
166	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma coelebs</i>
167	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
168	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
169	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>
170	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma latepunctatum</i>
171	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>
172	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>

### **Cultivo de garrapatas en medio bifásico agar sangre**

14 muestras de garrapata sin identificación taxonómica salieron negativas, además se debe mencionar que las muestras resultaron contaminadas con crecimiento de hongos y bacterias por lo que no se continuo el cultivo de las demás muestras. Las



muestras que no se cultivaron se guardaron en refrigeración para en un futuro procesarlas por biología molecular.

**Tabla 2.-Resultados por biología molecular**

# de orden rotulación	Procedencia	Huésped	cantidad de garrapatas	Estadio	Especies	Resultados kDNA PCR
1	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>	Negativo
2	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>	Negativo
3	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>	Negativo
4	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>	Negativo
5	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>	Negativo
6	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>	Negativo
7	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>	Negativo
8	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>	Negativo
9	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma naponense</i>	Negativo
10	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
11	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma naponense</i>	Negativo
12	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma naponense</i>	Negativo
13	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma naponense</i>	Negativo
14	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma naponense</i>	Negativo
15	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma naponense</i>	Negativo
16	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	Negativo
17	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	Negativo
18	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	Negativo
19	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
20	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
21	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
22	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
23	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	Negativo
24	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	Negativo
25	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	Negativo
26	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo

27	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
28	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	Negativo
29	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma ovale</i>	Negativo
32	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
33	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
35	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
36	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
37	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
38	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
39	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
40	San Lorenzo	Sachavaca	1	hembra	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
41	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
42	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
43	San Lorenzo	Sachavaca	1	macho	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	Negativo
44	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
45	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
46	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
47	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
48	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
49	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
50	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
51	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
52	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
53	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
54	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo

55	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
56	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
57	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
58	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
59	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
60	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
61	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
62	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
63	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
64	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
65	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
66	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	<b>POSITIVO</b>
67	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
68	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
69	Botijón	Sajino	1	hembra	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
70	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
71	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
72	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
73	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
74	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
75	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	<b>POSITIVO</b>
76	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
77	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
78	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
79	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus</i>	Negativo

					<i>(Boophilus) microplus</i>	
80	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
81	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	<b>POSITIVO</b>
82	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
83	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo
84	Botijón	Sajino	1	macho	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	Negativo

## Discusiones

De las 360 garrapatas capturadas (304 de origen animal y 56 de origen humano) 172 fueron clasificadas taxonomicamente, siendo 136 garrapatas de 3 sachavacas cazadas "*Tapirus terrestres*" y 168 de tres sajinos "*Tayassu tajacu*" cazados solo fueron procesadas las de origen animal 14 en suero fisiológico a través de cultivo y 84 muestras en alcohol por biología molecular debido a la limitación de recursos. Los resultados del cultivo fueron negativas además de contaminarse, es posible que falte un complemento de antibioterapia y fúngica.

De los resultados de las pruebas moleculares de 43 "*Tapirus terrestres*" y 41 garrapatas de "*Tayassu tajacu*" resultaron 3 garrapatas positivas a *Leishmania* sp del huésped *Tayassu tajacu* de la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* del género macho, estas muestras fueron sacadas de animales cazados en Botijón, distrito de Las Piedras, provincia Tambopata, región Madre de Dios. Por lo que se concluye que *Tayassu tajacu* es un reservorio silvestre para *Leishmania* sp y que *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se infecta al succionar la sangre del hospedero *Tayassu tajacu*

siendo un potencial trasmisor de *Leishmania* sp al ser humano ,en especial a las personas que se dedican a la caza,actividad maderera,minera y trabajos en flora y fauna que están en contacto con el follaje donde pueden quedar impregnadas estas garrapatas.Este trabajo es el primero a nivel mundial que reporta la identificación de *Leishmania* sp en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* del hospedero *Tayassu tajacu* sustentando la posible transmisión de *Leishmania* sp al ser humano por garrapatas como lo describen algunos pocos reportes.(1,2,3,5).

El presente trabajo estimulara futuros trabajos para identificar el rol de las garrapatas como vectores que transmitan *Leishmania* sp al ser humano.

- **Referencias Bibliográficas**

1. Colombo FA, Odorizzi RM, Laurenti MD, Galati EA, Canavez F, Pereira-Chioccolla, Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs, *Parasitol Res* 2011 August 109(2):267-74 Epub 2011 Jan 11
2. Dantas-Torres F, Latrofa MS, Otranto D, Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs, and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*, *Parasites & Vectors* 2011, 4(56):1-4
3. Dantas-Torres F, Ticks as vectors of *Leishmania* parasites, *Trends Parasitol* 2011 April, 27(4):155-9
4. Otranto D, Testini G, Dantas-Torres F, Latrofa MS, Vissotto de Paiva Diniz PP, de Caprariis D, Lia RP, Mencke N, Gioia DS, Diagnosis of canine vector-borne diseases in young dogs: a longitudinal study, *J Clin Microbiol* 2010 September, 48(9):3316-24

5. Dantas-Torres F, Testini LV, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, Mencke N, Brandao-Filho SP, Alves LC, Otranto D, Detectionj of Leishmania infantum in Rhipicephalum sanguineus ticks from Brazil and Italy, Parasitol Res 2010 March, 106(4): 857-60 Eoub 2010 Feb 3
6. Otranto D, Dantas-Torres F, Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives, Parasites & Vectors 2010 3(2):1-12
7. Dantas-Torres F, Review: Canine leishmaniosis in South America, Parasites & Vectors 2009 March, 2(Suppl1):S1