



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN NATURAL DE *Leishmania* spp. EN
ESPECÍMENES DE *Lutzomyia* spp., Y DETERMINACIÓN MOLECULAR DE
LOS HOSPEDEROS DE LOS QUE SE ALIMENTAN EN LAS PROVINCIAS DE
ESMERALDAS Y CHIMBORAZO.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

William Patricio Ponce, Ph.D.

Autora

Patricia Alejandra Chiluza Piedra

Año

2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

William Patricio Ponce

Entomología Ph.D.

CI: 1707786016

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

Patricia Alejandra Chiluzza Piedra

CI: 172151558 -1

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios mi razón de vivir, por darme la fortaleza para avanzar.

A mi familia, que pese a mis errores, me brindaron todo su amor, apoyo y confianza.

A Varsovia Cevallos, Ph.D. directora del Proyecto financiado por la Senescyt “Sistema nacional de vigilancia y alerta temprana para la malaria y leishmaniasis (SATVEC-FASE 1) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI). A los Dres. Patricio Ponce, Manuel Baldeón y miembros del CIT-UDLA por brindarme su amistad y orientación en mi vocación y confiar en mis capacidades. A la Universidad de las Américas, por permitirme ser parte de tan noble institución.

DEDICATORIA

A Dios por ser quien guía mi camino y fortalece mi caminar.

A mis padres, Fausto y Blanca, que me enseñaron a ver lo mejor en las cosas más simples y sobre todo que las oportunidades no te esperan, las aprovechas o simplemente se irán sin ti.

A mis hermanos por estar pendientes de mí a pesar de todo.

A Isaac por estar ahí junto a mi cuando ya no sabía cómo avanzar, su amor y paciencia me permitieron continuar.

A Pao, Salomé, David, Liz y Alejandra que estuvieron junto a mí siempre compartiendo su apoyo y locuras.

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida y transmitida por flebótomos del género *Lutzomyia*. En América del sur, la leishmaniasis cutánea es endémica en la mayoría de los países (Amóra, Bevilaqua, Feijó, Alves, y Maciel, 2009; Maroli, Feliciangeli, Bichaud, Charrel, y Gradoni, 2013). En Ecuador, el primer reporte sobre preferencia alimentaria en flebótomos y la identificación de especies fue realizada en Valle Hermoso, localidad ubicada en Santo Domingo de los Tsáchilas que es una zona hiperendémica de presencia de leishmaniasis (Anaguano et al., 2014). Este estudio se llevó a cabo en dos localidades correspondientes a las provincias de Esmeraldas (Lagarto) y Chimborazo (Cumandá) con el objetivo de identificar las especies de flebótomos que habitan en cada localidad, determinar sus fuentes alimenticias y detectar la infección de los mosquitos alimentados con *Leishmania* spp. Se identificaron 5 especies de flebótomos: *Pressatia dysponeta*, *Psychodopygus panamensis*, *Lutzomyia tortura*, *Trichophoromyia reburra* y *Micropygomyia cayennensis*. Se colectaron 136 hembras de flebótomos alimentadas. Se identificaron ingestas de sangre de gallina (64,7%), humano (16,2%), vaca (1,5%), cerdo (0,7%) y de mamíferos silvestres no identificados (11,8%). Por otra parte se detectó infección de *Leishmania* spp. en el 47% de hembras colectadas. Se observa una clara preferencia de los flebótomos, tanto de Lagarto como de Cumandá, por alimentarse de aves. *Pressatia dysponeta* fue la especie vector más común, con mayor porcentaje de infección y mayor frecuencia de ingesta aviar. Los resultados obtenidos en este trabajo, dan la idea de la distribución del vector, biología y ecología, incrementan el conocimiento para el desarrollo de mapa oficial de distribución del vector que a su vez, permita un mejor control de la enfermedad en el Ecuador.

Palabras clave: Leishmaniasis, flebótomos, infección natural, PCR, fuente de alimentación.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an important tropical disease transmitted by phlebotomine sandflies of *Lutzomyia* genus. Leishmaniasis is endemic in the majority of countries in southamerica (Amora, Bevilaqua, Feijó, Alves, and Maciel, 2009; Maroli, Feliciangeli, Bichaud, Charrel, and Gradoni, 2013). In Ecuador, the first report of host feeding sources in sandflies and identification of species was performed in Valle Hermoso, town located in Santo Domingo de los Tsáchilas which is a hyperendemic area of presence of leishmaniasis (Anaguano et al., 2014). In this study we identified sandflies species, sandflies blood meals and determine their natural infection with *Leishmania* spp. in two locations corresponding to the provinces of Esmeraldas (Lagarto) and Chimborazo (Cumandá). Five sandflies species were identified: *Pressatia dysponeta*, *Psychodopygus panamensis*, *Lutzomyia torture*, *reburra Trichophoromyia* and *Micropygomyia cayennensis*. 136 engorged females were collected. Identified blood meal from chicken (64.7%), human (16.2%), livestock (1.5%), pig (0.7%) and unidentified wild mammal (11.8%). Moreover detected infection of *Leishmania* spp. in 47% of females collected. There is a clear preference of sand flies, both Lagarto and Cumandá, for fowl. *Pressatia dysponeta* was the most common specie of vector, with highest percentage of infection and increased preference frequency for fowl blood meals. The results obtained in this work, give an idea of the distribution of the vector, biology and ecology. Increasing the knowledge to the official map of distribution of the vector that allows better control of the disease in Ecuador.

Key words: Leishmaniasis, sandfly, natural infection, PCR, blood meal.

ÍNDICE

Capítulo I. Introducción	1
1.1 Formulación del Problema	1
1.2 Justificación	3
1.4 Objetivos.....	4
1.4.1 Objetivo General.....	4
1.4.2 Objetivos específicos	4
Capítulo II. Marco Teórico	5
2.1. Leishmaniasis	5
2.1.1. Generalidades	5
2.1.2. Distribución geográfica	6
2.1.3. Epidemiología	7
2.1.4 Taxonomía del parásito	9
2.2.1. Apariencia y comportamiento	10
2.2.2. Distribución del vector	11
2.2.3. Biología del vector	11
2.2.4. Taxonomía del vector	11
Capítulo III. Metodología	13
3.1 Instituciones Participantes.....	13
3.2 Procedimientos	13
3.2.1 Áreas de estudio.....	13
3.2.2 Colecta de flebotomos en campo	15
3.2.3 Procesamiento, montaje e identificación taxonómica de flebotomos.....	16
3.2.4 Extracción de DNA total.....	18
3.2.5 Amplificación de ADN de ingestas alimentarias.....	19
3.2.6 Electroforesis de DNA en gel de agarosa	23
Capítulo IV. Resultados	25
4.1 Composición taxonómica de los flebotomos con ingesta sanguínea.	25

4.2 Detección de infección natural con <i>Leishmania</i> spp. de los flebótomos	32
4.3 Determinación de las fuentes alimenticias de los flebótomos	34
Capítulo V. Discusión.....	40
5.1 Composición taxonómica de flebótomos	40
5.2 Detección de infección natural con <i>Leishmaniasis</i> spp. de los flebótomos	42
5.3 Detección de fuentes alimentarias de los flebótomos	44
CAPITULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
6.1 CONCLUSIONES.....	48
6.2 RECOMENDACIONES	50
REFERENCIAS	51
ANEXOS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1a Ecosistemas y distribución de Leishmaniasis cutánea y mucocutánea en América, 2013.....	7
Figura 2. Mapa de ubicación de las zonas de colecta de especímenes en las provincias de Esmeraldas y Chimborazo.	14
Figura 3 Trampa CDC de luz normal, utilizada en las colectas de campo.	15
Figura 4 Ubicación de las trampas CDC en áreas de colecta. Trampas ubicadas a una altura promedio de 1 m en espacios cerrados por árboles.	16
Figura 5. Clasificación de los flebótomos por su sexo y condición para su posterior disección y montaje: a. Macho (25X), b. Hembra sin ingesta (15X) y c. hembra con ingesta (30X).	17
Figura 6 Estructuras de las espermatecas de diferentes especies de hembras con ingesta sanguínea; podemos observar que cada especie posee caracteres diferentes para la identificación taxonómica.	25
Figura 7. Distribución espacial de especies flebotomíneas colectadas.	28
Figura 8. Condición de flebótomos colectadas.	29
Figura 9. Condición de flebótomos colectadas.	30
Figura 10. Distribución de hembras flebotomíneas en Esmeraldas y Chimborazo.	31
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa (5%) del gen mitocondrial citocromo B del orden galliforme (201 bp) de ADN de flebótomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR-multiplex.	32
Figura 12. Distribución de los flebótomos infectados con <i>Leishmania</i> spp. por época y sitio de colecta en la localidad de Cumandá, Chimborazo.	33
Figura 13. Distribución de los flebótomos infectados con <i>Leishmania</i> spp. por época y sitio de colecta en la localidad de Lagarto, Esmeraldas.	33

Figura 14. Especies de hembras flebotomíneas infectadas con Leishmania spp.	34
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa (5%) del gen mitocondrial citocromo B de vertebrados muestra fragmentos (358bp) de ADN de flebótomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR.....	35
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa (5%) del gen mitocondrial citocromo B de mamíferos muestra fragmentos (330bp) de ADN de flebótomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR.....	36
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa (5%) del gen mitocondrial citocromo B de vaca, perro, humano, cabra y cerdo de ADN de flebótomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR- multiplex.	37
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa (5%) del gen mitocondrial citocromo B del orden galliforme (201 bp) de ADN de flebótomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR-multiplex.....	37
Figura 19. Fuentes alimenticias a nivel de especie de hembras flebotomíneas colectadas.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado usadas para la amplificación con primers específicos para vertebrados.....	19
Tabla 2 Concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado usadas para la amplificación con primers específicos para mamíferos.....	20
Tabla 3. Secuencias de los primers para la PCR múltiple.	21
Tabla 4. Concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado usadas para la amplificación multiplex con primers específicos para mamíferos domésticos y el primer universal UNREV 1025.	21
Tabla 5. Concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado usadas para la amplificación con primers específicos para el orden galliforme.	22
Tabla 6. Concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado usadas para la amplificación con primers específicos para tripanosomátidos.	23
Tabla 7. Abundancia de especies de flebótomos colectados en la Provincia de Chimborazo.....	26
Tabla 8. Abundancia de especies de flebótomos colectados en la Provincia de Esmeraldas.	27
Tabla 9. Fuentes alimenticias de hembras flebotomíneas infectadas con Leishmania spp. colectadas en las provincias de Esmeraldas y Chimborazo.....	39

Capítulo I. Introducción

1.1 Formulación del Problema

La leishmaniasis constituye un conjunto de enfermedades infecciosas ocasionada por diferentes especies de un parásito protozooario intracelular, (Guamán, Armijos, y Mancheno, 2013). El protozooario del género *Leishmania* se transmite por moscas del géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Calvopiña, Loor, Lara, Zambrano, y Hashiguchi, 2012). Esta parasitosis afecta a mamíferos, incluyendo a humanos. La enfermedad presenta tres formas clínicas, que van desde lesiones cutáneas y muco-cutáneas hasta afectación visceral (Nieves et al., 2014).

Es la novena enfermedad de importancia de transmisión vectorial entre las enfermedades infecciosas individuales, sin embargo, la leishmaniasis es considerada una enfermedad olvidada (Alvar et al., 2012).

Se ha estimado que anualmente se producen de 20.000 a 40.000 muertes por causa de la leishmaniasis, siendo Brasil uno de los 10 países con mayor incidencia de casos. No obstante, la investigación y el apoyo financiero en programas de control y eliminación son insuficientes (Alvar et al., 2012; Hotez et al., 2007).

Tanto el control como el diagnóstico temprano, en Latinoamérica, tienen grandes retos y limitaciones, debido a que no se toman en cuenta a los animales reservorios. En América del Sur se considera que el número de casos está subestimado (Alvar et al., 2012; OMS, 2013; Salomón, 2009).

En Ecuador esta endemia es frecuente, alrededor del 80% de las provincias han reportado casos de leishmaniasis con un desarrollo en su distribución y un aumento en el número de casos (Guamán et al., 2013). Los estudios actuales en Ecuador, en su mayoría, se han enfocado en el estudio del parásito y sus

efectos en la salud humana y en la ecología del parásito (Ofelia, Vargas Franklin, Hashiguchi Yoshihisa, Kato Hiroto, y Eduardo, 2011).

La complejidad que enfrenta el desarrollo de estudios acerca del vector y su comportamiento ecológico especialmente en la diferenciación de la diversidad de especies que posee y la determinación de infecciones naturales en varias regiones del país, han sido pocos (Salomón, 2009). Algunas especies de flebotomos y casos de leishmaniasis muestran una asociación directa con pueblos agrícolas donde el ganado se encuentra cerca de los habitantes que permiten la alimentación oportunista del vector con sangre de bovinos y de humanos (Davies et al., 2000). Además, cultivos de cacao y café, que forman parte de los bosques de las zonas endémicas, dan lugar a la formación de zonas calientes donde la transmisión es elevada debido a las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la mosca (OMS, 2010).

En Ecuador, el primer reporte de fuentes alimentarias de los flebotomos se lo realizó en Valle Hermoso, en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, que es una zona hiperendémica para la leishmaniasis en el Ecuador. Se determinó que *Trapidoi nyssomyia* fue la especie más común y que se alimenta principalmente de aves (Anaguano, Ponce, Baldeón, Santander, y Cevallos, 2015).

1.2 Justificación

El único estudio sobre fuentes de alimentación de flebótomos y porcentaje de infección e identificación de los vectores se lo realizó en una zona hiperendémica en el Ecuador conocida como Valle Hermoso (Anaguano et al., 2015). La importancia de tener información en otros sitios hiper-endémicos permitirá obtener datos de las fuentes alimentarias e infección natural de flebótomos con *Leishmania* spp, ampliando la comprensión de la epidemiología de la enfermedad. La identificación de hospederos involucrados en los mecanismos de transmisión y la comprensión del comportamiento ecológico del vector, incluyendo su conducta alimenticia, ayudarán a formular programas de prevención y control.

Este trabajo complementa los datos citados anteriormente y aporta información de zonas geográficas distintas. Para la selección de las localidades se tomaron en cuenta los datos emitidos por el Ministerio de Salud Pública. Las provincias escogidas tenían una incidencia significativa de leishmaniasis en años previos.

En la actualidad, la utilización de métodos a nivel molecular basadas en PCR permiten identificar los vectores y se puede detectar de manera directa sus fuentes alimentarias (Abbasi, Cunio, y Warburg, 2009; Kent, Rebekah J. y Norris, Douglas E., 2005; Ngo, K. A. y Kramer, L. D., 2003). El uso de técnicas moleculares permite el estudio efectivo del comportamiento vector-hospedero y el perfeccionamiento de sistemas de control del vector en la enfermedad (Anaguano et al., 2015; Kent, Rebekah J. y Norris, Douglas E., 2005; Sant'Anna et al., 2008).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Detectar la infección natural de parásitos de la familia Trypanosomatidae en especímenes de *Lutzomyia* spp., y determinar molecularmente los hospederos de los que se alimenta.

1.4.2 Objetivos específicos

Identificar la diversidad de especies de *Lutzomyia* en las localidades de estudio.

Detectar la presencia de tripanosomátidos en hembras de *Lutzomyia* spp. mediante el uso de PCR.

Determinar la procedencia de la ingesta sanguínea en hembras de *Lutzomyia* spp. mediante el uso de PCR multiplex.

Capítulo II. Marco Teórico

2.1. Leishmaniasis

2.1.1. Generalidades

Leishmania (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) es un protozoo que causa el conjunto de enfermedades conocidas como leishmaniasis (Claborn, 2010; Nicolas et al., 2002). Incluye dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, cuya diferencia se da por el lugar donde se desarrolla en el tracto digestivo dentro del flebotómíneo (Kala-azar, 2009). Los vectores pertenecen al género *Phlebotomus* en viejo mundo (Europa, Asia y África) y al género *Lutzomyia* en el neotrópico (Calvopiña et al., 2012). Además, según la especie involucrada, la leishmaniasis posee gran variedad de reservorios que pueden ser vertebrados, incluido el humano (Dostálová y Volf, 2012).

Esta enfermedad, afecta principalmente a las áreas suburbanas y rurales, donde la pobreza y las condiciones del sistema de salud son deficientes (OMS, 2012). A esto se puede añadir la constante migración interna, el aumento de movimiento de personas en busca de trabajo a zonas endémicas de la enfermedad y el continuo desarrollo de proyecto petroleros en áreas donde el ciclo de trasmisión va aumentando constantemente, lo que permite el aumento del contacto del ser humano con el vector y el parásito (Desjeux, Philippe, 2004).

A nivel mundial, 22 especies de *Leishmania* son consideradas patogénicas para el humano, 15 de ellas están presentes en el continente Americano (OPS, 2013). En América, la leishmaniasis posee una alta morbilidad y a su vez una amplia distribución, además su transmisión zoonótica requiere diferentes especies de parásitos, vectores y reservorios (OPS y OMS, 2015). Por esta razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la leishmaniasis es un problema de salud pública y una enfermedad tropical desatendida (OMS, 2013).

En Ecuador, el primer reporte de leishmaniasis fue en el año de 1920 (Zapata, Mejia, et al., 2012) y actualmente es endémica en la Costa, Sierra y Amazonía. En zonas propicias de transmisión la enfermedad se presenta a altitudes de 300 a 1500 metros sobre el nivel del mar (Armijos et al., 1997).

Los nombres con los que se le conoce a esta enfermedad varían de región a región. Es así como en la Costa es llamada como *sarna brava*, *charra brava* o *charra colombiana*. En la región Amazónica se la conoce como *milliaa caracha* o *ulcera brava* cuando se habla de leishmaniasis cutánea, con la mucocutánea se la llama lepra de montaña. Y en los Andes es llamada *nigua de ratón* o *grano malo*. En las tres regiones el vector es conocido como *manta blanca* (Calvopina, 2004).

2.1.2. Distribución geográfica

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), para el año 2015, la distribución de casos de leishmaniasis cutánea y muco-cutánea tuvo un rango de casos entre 1 y 3.058. Además, la presencia de áreas con bosques tropicales y subtropicales de tipo densa, húmeda, templada y seca existe un aumento en el número de casos reportados debido a que estos nichos ecológicos son adecuados para el desarrollo del vector y sus reservorios (Figura 1a). En la figura 1b, se observa la incidencia de casos de leishmaniasis cutánea y muco-cutánea por 100.000 habitantes y por municipio, de acuerdo al nivel de transmisión en baja, media, alta, intensa y muy intensa (OPS y OMS, 2015).

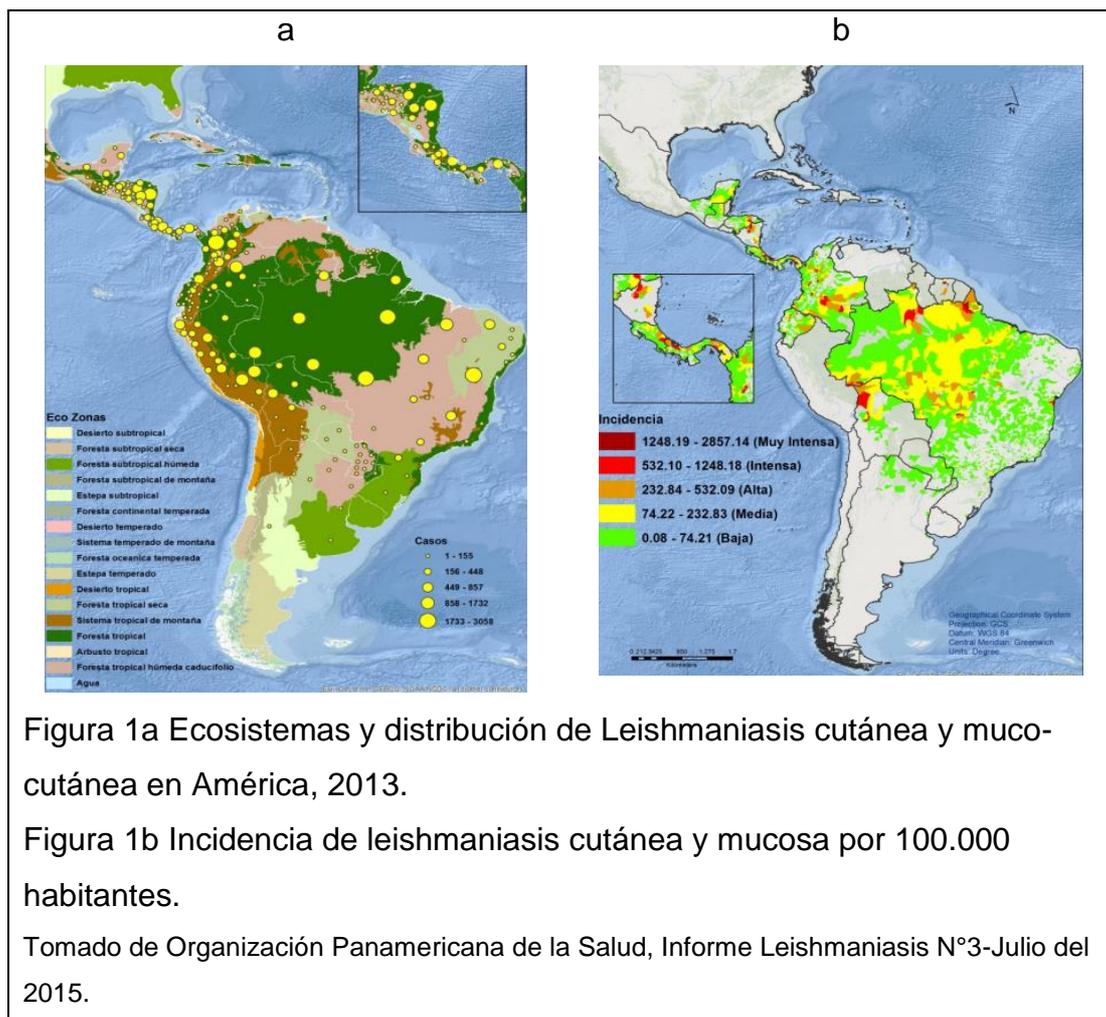


Figura 1a Ecosistemas y distribución de Leishmaniasis cutánea y mucocutánea en América, 2013.

Figura 1b Incidencia de leishmaniasis cutánea y mucosa por 100.000 habitantes.

Tomado de Organización Panamericana de la Salud, Informe Leishmaniasis N°3-Julio del 2015.

En Ecuador, según datos del Ministerio de Salud Pública (MSP), durante el periodo 2002-2013, la enfermedad se distribuye en 23 de las 24 provincias, con excepción de Galápagos, los casos registrados con un promedio de 1512 casos anuales y una tasa de incidencia de 9,7 por 100.000 habitantes. Además, según la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2014), el mayor número de casos reportados en el país se centra en cuatro provincias de Esmeraldas, Pichincha, Orellana y Morona Santiago.

2.1.3. Epidemiología

La leishmaniasis ha sido considerada un problema de salud pública durante los últimos años por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y Organización Mundial de la Salud (OMS) debido a que puede causar muerte,

incapacidad y mutilaciones (Organización Mundial de la Salud, 2010). Varios factores han permitido el creciente interés en su epidemiología, programas de control y vigilancia para el diagnóstico temprano, tratamiento adecuado y reducción del contacto entre el vector y el hombre en los países donde existe la enfermedad de forma endémica (Claborn, 2010).

2.1.3.1 Leishmaniasis cutánea

También conocida como Leishmaniasis tegumentaria americana, es endémica en Ecuador y se la encuentra en regiones que poseen ecologías tropicales y subtropicales, aunque también se la puede encontrar en valles interandinos (Calvopiña, Martínez, y Hashiguchi, 2013).

Esta forma clínica, afecta a zonas del cuerpo donde la mosca tiene accesibilidad a la piel desnuda. Los parásitos asociados a la leishmaniasis cutánea son: *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana* para el continente americano y *Leishmania major* para el viejo mundo (Claborn, 2010). La lesión se presenta a manera de una pápula que posteriormente se convertirá en una ulcera que produce dolor y picor, esta lesión únicamente aparece en el lugar donde se dio la picadura de la mosca. Por otro lado, existe otro tipo de leishmaniasis cutánea llamada difusa en la cual las lesiones se diseminan a través de la piel asemejándose a la lepra (Claborn, 2010; Organización Mundial de la Salud, 2010).

2.1.3.2 Leishmaniasis muco-cutánea

Se encuentra en regiones que poseen ecologías tropicales y húmedas con un índice pluvial regular, no obstante, también pueden habitar en lugares secos (A.G.M.F et al., 2014; Calvopiña et al., 2013).

Causado principalmente por *Leishmania braziliensis* y ocasionalmente por *Leishmania aethiopica*, la leishmaniasis muco-cutánea produce lesiones

destructivas y deformantes en zonas donde se desarrollan, tal puede ser el daño que puede llegar a causar la muerte debido a las complicaciones que puede presentar por neumonía aspirativa o por asfixia. (A.G.M.F et al., 2014; Organización Mundial de la Salud, 2010).

2.1.4 Taxonomía del parásito

El protozooario *Leishmania* se agrupa en el phylum Sarcomastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, suborden Nematocera, familia Trypanosomatidae y género *Leishmania*.

La taxonomía de las especies de *Leishmania* constituye un tópico controversial. El criterio taxonómico para la leishmaniasis en el neotrópico que produce la leishmaniasis cutánea y muco-cutánea lo realizaron mediante la separación de dos complejos, uno denominado barzilensis, subdividido en las siguientes especies: *Leishmania (vianna) braziliensis*, *L. (V) panamensis*, *L. (V) guyanensis* y *L. (V) peruviana* y el segundo complejo denominado mexicana, subdividido en las siguientes especies: *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *L. (L) pifanio*, *L. (L) amazonensis*, *L. (L) gamhami* y *L. (L) venezuelensis*.

Esta clasificación fue elaborada en base a la unificación de hallazgos clínicos, serológicos, inmunopatológicos, epidemiológicos y geográficos, y por la caracterización de aislados del parásito. Recientemente para la designación de especies han sido tomados en cuenta otros criterios más sofisticados, como es estudio bioquímico de los parásitos mediante el análisis secuencial del DNA del kinetoplasto o kDNA, perfiles de isoenzimas y mediante la utilización de anticuerpos monoclonales útiles en la determinación de especies del parásito (Organización Mundial de la Salud, 2010).

2.2. Flebótomos

2.2.1. Apariencia y comportamiento

Los flebótomos son pequeños insectos de la familia Psychodidae del orden Diptera con una longitud aproximada de 2-3 mm. Su color varía de más o menos blanco a casi negro. Posee tres características que lo hacen fácil de reconocer del resto de insectos: sus alas forman un ángulo sobre el abdomen cuando se encuentran en reposo, todo su cuerpo está cubierto de pelo y a diferencia del resto de moscas, su vuelo es corto y sigiloso con un peculiar movimiento a modo de salto. Varios estudios han demostrado que la distancia de vuelo varía entre especies pero rara vez supera un kilómetro. Su velocidad máxima de vuelo es un poco menos de 1m/s (OPS y OMS, 2015). El hábitat en el que se desarrollan tiende a ser frío y húmedo, por esta razón, suelen encontrarse en casa; letrinas; establos; cuevas; rocas o en el suelo; también en lugares con vegetación densa dentro de madrigueras de roedores y otros mamíferos; nidos de pájaro; y termitas. Su actividad es crepuscular o nocturna, a pesar de, son pocas las especies que pican durante el día. Únicamente, las moscas hembras se alimentan de sangre para la producción de huevos, y sus picaduras son dolorosas, en su mayoría son exofágicas, es decir, que muerden al aire libre, pero también existen especies exofílicas que son aquellas que descansan al aire libre durante los periodos de maduración de huevos. Por otro lado, existen especies endofílicas que descansan en el nido durante la maduración de huevos (Killick-Kendrick, 1999; Maroli et al., 2013).

En la actualidad se conocen alrededor de 800 especies de flebótomos, en cinco géneros principales; en el viejo mundo tenemos: *Phlebotomus* (94 especies) y *Sergentomyia* (258 especies) y en el nuevo mundo *Lutzomyia* (379 especies), *Bruptomyia* (23 especies) y *Warileya* (5 especies) y de estos, los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* han sido probados como vectores de *Leishmania* (Young, David G. y Duncan, Margo A., 1994).

2.2.2. Distribución del vector

Las moscas de arena se encuentran distribuidas principalmente en las regiones con clima cálido en el mundo incluyendo el sur de Europa, Asia, África, Australia y América Central y América del Sur, a excepción de Nueva Zelanda y las islas de Pacífico (Killick-Kendrick, 1999; Maroli et al., 2013; Ready, 2013). En cuanto a altitud su distribución va desde 5 a 3300 metros sobre el nivel del mar (Anaguano et al., 2015; Maroli et al., 2013).

2.2.3. Biología del vector

A diferencia de los mosquitos culícidos, los flebótomos en sus etapas inmaduras no necesitan de agua para completar su desarrollo, aunque necesitan de hábitats cálidos y húmedos. Los flebótomos experimentan una metamorfosis completa, la cual se divide en cuatro etapas: huevo, larva (cuatro estadios), pupa y adulto. La ovoposición las hembras adultas lo hacen en lugares ricos en materia orgánica, la cual provee de refugio, humedad y nutrición a las larvas recién emergidas. Los huevos miden alrededor de 0.3-0.5 mm de longitud, poseen en su inicio un color blanco o gris claro, pero tienden a tomar un color marrón oscuro o negro después de la ovoposición. Las hembras requieren de sangre para completar el desarrollo del lote de huevos. Su eclosión es dependiente de la temperatura y el desarrollo de las larvas es habitualmente lento. Por otro lado, solo algunas especies de moscas son capaces de producir huevos viables sin necesidad de sangre (Killick-Kendrick, 1999; Maroli et al., 2013; Ready, 2013).

2.2.4. Taxonomía del vector

Los flebótomos se agrupan en el phylum Artrópoda, clase Insecta, orden Diptera, suborden Nematocera, familia Psychodidae y subfamilia Phlebotominae (Anaguano et al., 2015; Killick-Kendrick, 1999; Maroli et al., 2013).

La identificación taxonómica de los flebótomos ha sido un tema controversial, complicado y lejos de ser definitivo. Actualmente se registran 3 géneros en el Viejo mundo: *Phlebotomus*, *Sergentomyia* y *Chinius* (Organización Mundial de la Salud, 2010). A pesar de que existen controversias para la clasificación de especies en el Nuevo Mundo, los investigadores en su mayoría aceptan la propuesta de Lewis et al. (1977) para los flebótomos de la región Neo tropical, posteriormente Young y Duncan (1994), reconocen tres géneros *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya* (Maroli et al., 2013; Organización Mundial de la Salud, 2010). Por otro lado, Galati (2003) en su más reciente revisión, reconoció 464 especies de flebótomos los cuales se agrupan en 23 géneros, 20 subgéneros y tres grupos de especies y 28 series (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Capítulo III. Metodología

3.1 Instituciones Participantes

El trabajo de titulación DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN NATURAL DE *Leishmania spp.* EN ESPECÍMENES DE *Lutzomyia spp.*, Y DETERMINACIÓN MOLECULAR DE LOS HOSPEDEROS DE LOS QUE SE ALIMENTAN EN LAS PROVINCIAS DE ESMERALDAS Y CHIMBORAZO, fue realizado en los laboratorios del Centro de Investigación Traslacional (CIT) de la Universidad de las Américas en colaboración con el área de Entomología del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI). La investigación forma parte del proyecto “Sistema nacional de vigilancia y alerta temprana para el control de los vectores de Malaria y Leishmaniasis”, proyecto que se lleva a cabo con el financiamiento de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) y la Universidad de las Américas (UDLA). Parte de la investigación indicada ha sido motivo de este trabajo de pregrado previo a la obtención del título de ingeniera en biotecnología de la Universidad de las Américas-UDLA.

3.2 Procedimientos

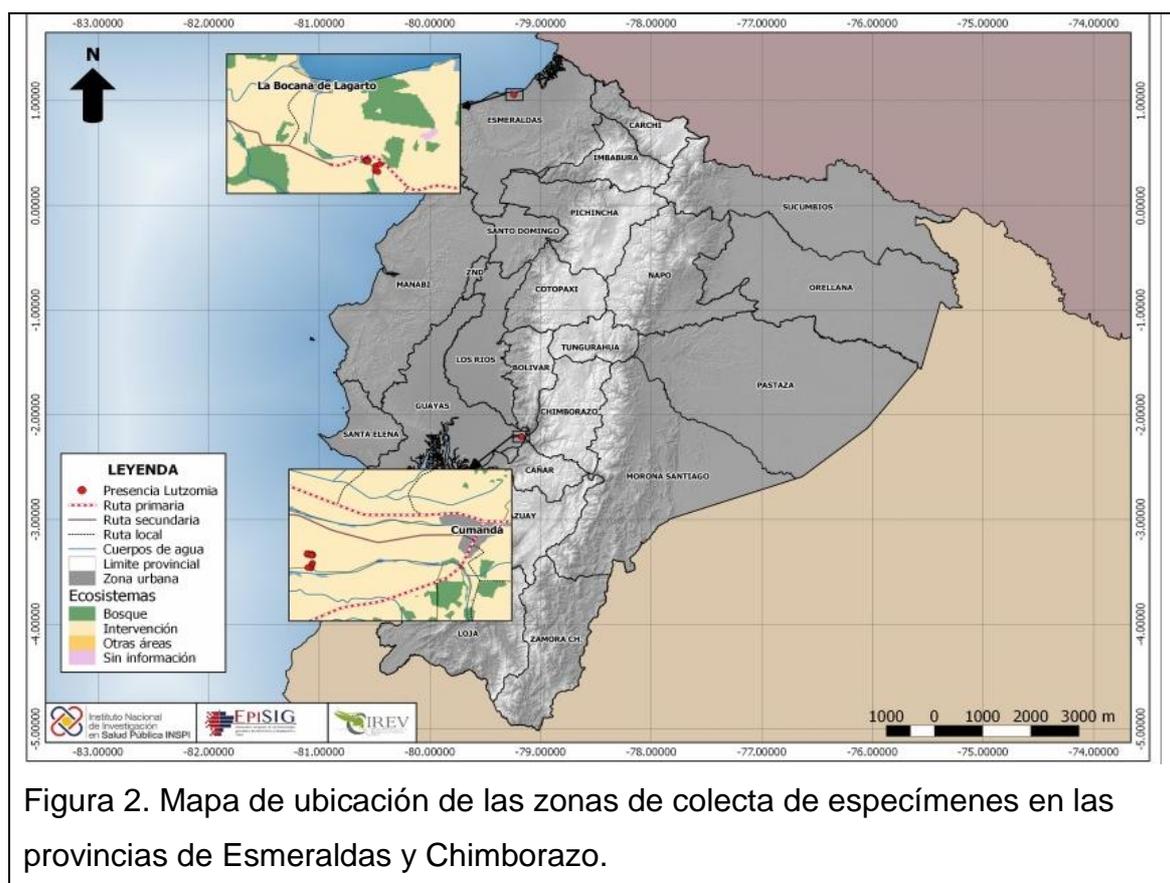
3.2.1 Áreas de estudio

El estudio se realizó en dos localidades de las provincias de Esmeraldas y Chimborazo.

En la provincia de Esmeraldas se realizó el estudio en Lagarto, cantón Río Verde. Según Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2013), se registraron aproximadamente 207 casos de leishmaniasis durante el 2013. Geográficamente, la parroquia de Lagarto se encuentra ubicada en 01°04'00" de latitud norte, 79°15'30" de longitud occidental y a una altura de aproximada de 3 msnm (Figura 2). El bosque es húmedo tropical, con temperaturas medias anuales que sobrepasan los 25 °C y

una humedad relativa del 85%. Las precipitaciones pluviométricas son de aproximadamente 500 mm (Palacios y Ontaneda, 2013).

La segunda localidad de colecta se encuentra ubicada en el cantón Cumandá, al sur oeste de la provincia de Chimborazo. Según Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2013), se registraron aproximadamente 14 casos de leishmaniasis durante el 2013. Geográficamente, se encuentra ubicada en 2°14'38.35" de latitud sur, 79°03'33,60" de longitud occidental y con una altura de 450 msnm aproximadamente (Figura 2). La zona de bosque húmedo tropical, presenta temperaturas medias anuales de 20 °C y una humedad relativa del 70%. Las precipitaciones anuales son de aproximadamente 1500-1750 mm (Palacios y Ontaneda, 2013).



3.2.2 Colecta de flebótomos en campo

Para la colecta de individuos flebótomos se utilizaron trampas de luz normal tipo CDC (BioQuip Products, USA) (Figura 3), las cuales son utilizadas en capturas nocturnas. Actúan atrayendo a las lutzomias por medio de la luz y estas a su vez son succionadas por un flujo de aire generado por una hélice (Córdova, Vargas, Hashiguchi, Kato, y Gómez, 2011; Desjeux, P, 2004).



Figura 3 Trampa CDC de luz normal, utilizada en las colectas de campo.

La colocación de las trampas en cada área de trabajo se basó en el modelo transecto lineal. En este modelo, se descartan las elevaciones del suelo, tomado toda medición como si se encontrara todo a una misma altura, registrando toda especie que toca la línea del transecto. Para esto, se necesita la ubicación exacta del área de estudio en un mapa, acompañado de datos ambientales de la zona (Anaguano et al., 2015). Las trampas fueron ubicadas en seis puntos del área de estudio a una distancia de 150 m el uno del otro, iniciando por el punto más cercano a la zona peri domiciliar y el último punto el más alejado a la zona peri domiciliar.

Las capturas se realizaron en dos salidas de campo en dos épocas diferentes del año (seca-lluviosa). La primera colecta se realizó en las dos localidades en Septiembre y Octubre, meses que corresponden la temporada seca. La segunda salida fue en los meses de Marzo y Abril, época lluviosa. Las colectas

se realizaron durante tres noches seguidas y las trampas fueron instaladas desde las 18h00 hasta las 06h00 del día siguiente.

La altura máxima en la que se colocaron las trampas no sobrepasó el 1 m en zonas cerradas del bosque junto a madrigueras y hoyos formados por arboles de la zona (Figura 4).



3.2.3 Procesamiento, montaje e identificación taxonómica de flebótomos

Los insectos colectados en el campo fueron mantenidos vivos y transportados en cajas Petri de plástico para ser procesados en el laboratorio, donde fueron sacrificados exponiéndolos a 4°C durante una hora. Después, se clasificaron por trampa, día y época de colecta. Con ayuda de un estereoscopio Discovery VI2 (ZEISS, Alemania), de cada trampa se separaron hembras y machos, asimismo, las hembras con ingesta sanguínea (Figura 5). Los individuos con

ingesta sanguínea fueron disectados la cabeza del tórax, y se retiraron los últimos segmentos del abdomen y se tomó un ala para la identificación morfológica. El tórax junto con el resto del abdomen y las alas fueron almacenados a -20°C en micro tubos individuales etiquetados para su posterior extracción de ADN.

La cabeza, el ala y los últimos segmentos del abdomen de los individuos con ingesta sanguínea, fueron clarificados de forma química con hidróxido de potasio al 10% durante 8 horas para visualizar las estructuras internas esclerotizadas indispensables para la identificación taxonómica. Las partes clarificadas se montaron en un medio permanente de Bálsamo de Canadá para microscopia (Merck®) sobre un porta objetos, con cada parte sumergida previamente en xilol (Merck®). Una vez seco, mediante un microscopio Axio Scope.A1 (ZEISS, Alemania) se identificaron los especímenes según la clave taxonómica de Young y Duncan (Young, D.G. y Duncan, M.A., 1994) en base a las similitudes del cibario, palpos, alas y espermatecas del flebótomo, documentadas en fotografías de las especies identificadas.



3.2.4 Extracción de DNA total

Para la obtención del ADN a partir de los abdómenes de las hembras alimentadas individuales se utilizó el kit DNeasy Blood® & Tissue (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Los abdómenes separados se colocaron en micro tubos estériles de 1.5 mL individuales y correctamente rotulados.
- Colocar 60 μ L de Buffer ATL y cortar usando tijera de microdissección el abdomen hasta lograr que los pedazos sean imperceptibles.
- Colocar 20 μ L de Proteinasa K e incubar a 56°C durante toda la noche.
- Al siguiente día, se sometió a vórtex por 15 segundos. Se agregó 200 μ L del buffer AL y se mezcló por vórtex.
- Se añadió 200 μ L de etanol al 100% y se mezcló mediante vórtex.
- Se colocó el lisado en un tubo colector de 2 mL. Se procedió a centrifugar a 8000 rpm por un minuto y se descartó el filtrado.
- Posteriormente, se añadió 500 μ L de buffer AW1 y se centrifugo por un minuto a 8000 rpm. Se descartó el filtrado.
- Después, se añadió 500 μ L de buffer AW2 y se centrifugo por tres minutos a 14000 rpm. Se descartó el filtrado.
- Finalmente, se colocó el tubo colector en un tubo de 1.5 mL y se colocó 100 μ L el buffer de elución AE. Se dejó incubar por un minuto y se centrifugo por un minuto a 8000 rpm para eluir.

Para la cuantificación del ADN extraído se realizó la medición de la absorbancia (260/280) con espectrofotometría en el equipo Synergy HT (BioTek Instruments, USA). Su conservación se la realizó en frío a -20°C hasta su utilización en las amplificaciones de primers específicos.

Para el estudio a nivel molecular se investigaron los genes de los vertebrados que son las fuentes alimentarias viables de los flebótomos, además de un gen específico de la familia Trypanosomatidae, que incluye a los géneros *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Endotrypanum*.

3.2.5 Amplificación de ADN de ingestas alimentarias

Para las amplificaciones de ADN se utilizó un termociclador Mastercycler Pro (Eppendorf, Alemania). En todos los ensayos se utilizó DNA polimerasa PlatinumTaq (Invitrogen, Life Technologies, USA). Los primers fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies en Estados Unidos.

3.2.5.1 Amplificación de DNA mitocondrial de vertebrados

El conjunto de primers utilizado para la amplificación de ADN mitocondrial de vertebrados fue L14841 (forward, 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') y H15149 (reverse, 5'-CCCCTCA GAATGATATTTGTCCTCA-3'). Un fragmento de 358 bp del gen mitocondrial citocromo B específico para vertebrados (Lah, Ahamad, Haron, y Ming, 2012; Maleki-Ravasan et al., 2009; Oshaghi et al., 2005). Las condiciones de reacción y programa de termociclado se encuentran descritas en la Tabla 1.

Tabla 1 Concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado usadas para la amplificación con primers específicos para vertebrados.

Reactivos	Concentración	Perfil térmico	
PCR			
Buffer	1 x	Desnaturalización inicial	95°C x 5 min.
MgCl ₂	2 Mm	<i>40 ciclos</i>	
Primers (c/u)	0,5 µM	Desnaturalización	95°C x 30 s.
dNTPs	0,4 mM	Alineamiento de primers	58°C x 30 s.
Taq polimerasa	1,25 U/Rx	Extensión	72°C x 45 s.
DNA molde	25 ng/Rx		
<i>Volumen final</i>	<i>25 µL</i>	Extensión final	72°C x 5 min.

El control positivo fue DNA total extraído mediante el DNeasy Blood® & Tissue (Qiagen) a partir de una muestra de sangre humana. Agua destilada libre de

nucleasas se utilizó como control negativo para descartar contaminación externa durante la manipulación y preparación de cada reacción.

3.2.5.2 Amplificación de DNA nuclear de mamíferos

Se utilizó un par de primers PNOC-F (forward, 5'-GCATCCTTGAGTGTGAAGAGAA-3') y PNOC-R (reverse, 5'-TGCCTCATAAACTCACTGAACC-3'), los cuales amplifican un fracción de 330 bp del gen nuclear que codifica la Prepronocicpetina (PNOC), el cual es específico para mamíferos (Haouas et al., 2007). Las condiciones de reacción y programa de termociclado están descritas en la Tabla 2.

Tabla 2 Concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado usadas para la amplificación con primers específicos para mamíferos.

Reactivos PCR	Concentración	Perfil térmico	
Buffer	1 x	Desnaturalización inicial	95°C x 8 min.
MgCl ₂	3 mM	<i>40 ciclos</i>	
Primers (c/u)	0,6 µM	Desnaturalización	95°C x 30 s.
dNTPs	0,6 mM	Alineamiento de primers	56°C x 30 s.
Taq polimerasa	1,25 U/Rx	Extensión	72°C x 45 s.
DNA molde	25 ng/Rx		
<i>Volumen final</i>	<i>25 µL</i>	Extensión final	72°C x 5 min.

El control positivo fue ADN extraído mediante el DNeasy Blood® & Tissue (Qiagen) a partir de una muestra de sangre humana y agua destilada libre de nucleasas se utilizó como control negativo, para descartar contaminación externa durante la manipulación y preparación de cada reacción.

3.2.5.3 Amplificación de DNA mitocondrial de mamíferos domésticos

La PCR múltiple se llevó a cabo bajo las condiciones de reacción y termociclado descritos en la Tabla 4. Los fragmentos amplificados pertenecen al gen mitocondrial citocromo B de cuatro mamíferos domésticos que poseen

diferentes tamaños de fragmento específico (Kent, Rebekah J y Norris, Douglas E, 2005). Las secuencias de los primers en dirección 5'-3' fue específica para los hospederos y se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de los primers para la PCR múltiple.

Hospedero	Primer	Secuencia (5'-3')	Fragmento (bp)
<i>Homo sapiens</i>	Human741F	GGCTTACTTCTCTTCATTCTCTCCT	334
<i>Sus scrofa domestica</i>	Pig573F	CCTCGCAGCCGTACATCTC	453
<i>Bos Taurus</i>	Cow121F	CATCGGCACAAATTTAGTCG	561
<i>Canis familiaris</i>	Dog368F	GGAATTGTACTATTATTCGCAACCA T	680
<i>Capra hircus</i>	Goat1894F	CCTAATCTTAGTACTTGTACCCTTCC TC	132
	UNREV1025	GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA	-

Tabla 4. Concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado usadas para la amplificación multiplex con primers específicos para mamíferos domésticos y el primer universal UNREV 1025.

Reactivos PCR	Concentración	Perfil térmico	
Buffer	1 x	Desnaturalización inicial	95°C x 5 min.
MgCl ₂	3,5 mM	35 ciclos	
Primers (c/u)	0,4 µM	Desnaturalización	95°C x 1 min.
dNTPs	0,8 mM	Alineamiento de primers	58°C x 1 min.
Taq polimerasa	2,5 U/Rx	Extensión	72°C x 1 min.
DNA molde	25 ng/Rx		
<i>Volumen final</i>	25 µL	Extensión final	72°C x 7 min.

El control positivo fue ADN total extraído mediante el DNeasy Blood® & Tissue (Qiagen) a partir de muestras de sangre de cabra, vaca, humano, cerdo y perro. Agua destilada libre de nucleasas se utilizó para descartar contaminación externa durante la manipulación y preparación de cada reacción.

3.2.5.4 Amplificación de DNA mitocondrial de gallinas

El conjunto de primers utilizados fueron GallF (forward, 5'-ATTTCGGCTCCCTATTAGCAG-3') y GallR (reverse, 5'-GTCCGATGTGAAGGAAGATACAGATGAAGAAGAA-3'). Se amplificó un fragmento del gen mitocondrial de citocromo B específico para el orden Galliformes con un fragmento de amplificación de 210bp (Chang, Teng, Chen, Chen, y Jeng, 2008; Garcia-Rejon et al., 2010; Ngo, K.A. y Kramer, L.D., 2003). Las condiciones de reacción y programa de termociclado están descritas en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado usadas para la amplificación con primers específicos para el orden galliforme.

Reactivos PCR	Concentración	Perfil térmico	
Buffer	1 x	Desnaturalización inicial	94°C x 5 min.
MgCl ₂	2 mM	<i>40 ciclos</i>	
Primers (c/u)	0,6 µM	Desnaturalización	94°C x 30 s.
dNTPs	0,4 mM	Alineamiento de primers	60°C x 30 s.
Taq polimerasa	2,5 U/Rx	Extensión	72°C x 90 s.
DNA molde	25 ng/Rx		
<i>Volumen final</i>	<i>25 µL</i>	Extensión final	72°C x 4 min.

El control positivo fue ADN total extraído mediante el DNeasy Blood® & Tissue (Qiagen) de una muestra de sangre de gallina. Agua destilada libre de nucleasas se utilizó para descartar contaminación externa durante la manipulación y preparación de cada reacción.

3.2.5.5 Amplificación de DNA de *Leishmania* spp.

Para la detección de infecciones naturales con *Leishmania* spp. se han utilizado un set de primers específicos para la familia Trypanosomatidae, dentro de la cual se incluyen géneros de importancia médica como *Leishmania* y *Trypanosoma*; y el género *Endotrypanum*, genéticamente muy relacionado a *Leishmania*.

3.2.5.6 Amplificación de DNA del cinetoplasto de la familia Trypanosomatidae

El conjunto de primers utilizados fueron JW11 (forward, 5'-CCTATTTTACACCAACCCCCAGT-3') y JW12 (reverse, 5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3'). Del DNA del minicírculo del cinetoplasto, parte del genoma mitocondrial de los tripanosomátidos, se amplificó un fragmento de 120 bp (Nicolas, Prina, Lang, y Milon, 2002; Sant'Anna et al., 2014; Zapata, Mejia, et al., 2012). Las condiciones de reacción y programa de termociclado descritas en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado usadas para la amplificación con primers específicos para tripanosomátidos.

Reactivos PCR	Concentración	Perfil térmico	
Buffer	1,2 x	Desnaturalización inicial	95°C x 4 min.
MgCl ₂	3 mM	<i>35 ciclos</i>	
Primers (c/u)	0,4 µM	Desnaturalización	95°C x 1 min.
dNTPs	0,6 mM	Alineamiento de primers	58°C x 30 s.
Taq polimerasa	2,5 u/rxn	Extensión	74°C x 30 s.
DNA molde	5 µL		
<i>Volumen final</i>	<i>25 µL</i>	Extensión final	72°C x 10 min.

El control fue ADN extraído mediante el DNeasy Blood® & Tissue (Qiagen) de cultivos de *Leishmania tarentolae* del Centro de Investigación Traslacional de la UDLA. Agua destilada libre de nucleasas se usó para descartar contaminación externa durante la manipulación y preparación de cada reacción.

3.2.6 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

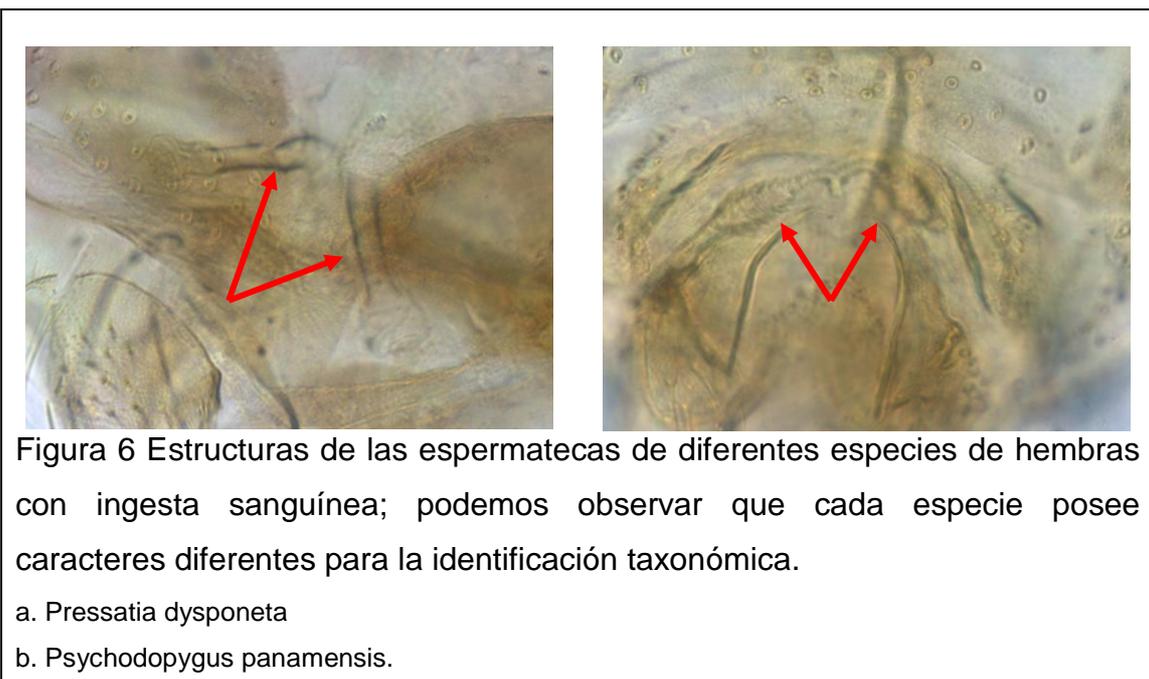
Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. El gel fue teñido con colorante SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain. Los productos se cargaron en el gel mezclando 8 µL de producto de PCR con 2µL de BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X). Finalmente, se corrió la

electroforesis en buffer TBE 0.5X a 85 voltios durante 45 minutos. La fotografía para su documentación se realizó bajo luz ultravioleta en el sistema de documentación Enduro GDS (Labnet International, USA).

Capítulo IV. Resultados

4.1 Composición taxonómica de los flebótomos con ingesta sanguínea.

En cuanto a la composición taxonómica de las hembras con ingesta sanguínea de las dos localidades, se pudo observar la presencia de 5 especies, *Lutzomyia tortura* (Young y Rogers), *Pressatia dysponeta* (Fairchild y Hertig), *Psychodopygus panamensis* (Shannon), *Trichophoromyia reburra* (Fairchild y Hertig), *Micropygomyia cayennensis* (Floch y Abonnenc), las cuales fueron identificadas y clasificadas morfológicamente mediante la comparación de sus estructuras internas del cibario que es segmento del aparato digestivo situado oralmente a la faringe donde se puede observar el número y forma de los dientes horizontales posteriores, las hileras de dientes verticales anteriores y la forma y extensión oral del área pigmentada y espermatecas que son segmentos pares del aparato genital con función de depósito de espermatozoides (Figura 6) con las reportadas en la clave taxonómica de Young y Duncan (1994). Pocos especímenes no pudieron ser identificados, debido a que su cabeza o abdomen se extraviaron o se destruyeron durante el manejo.



Cabe resaltar que la especie *Pressatia dysponeta* fue la más abundante, con 36,8% de los flebotomíneos capturados en ambas localidades, en contraste con las demás especies, que se hallaron en porcentajes menores, *Lutzomyia tortura* (0,7%), *Psychodopygus panamensis* (2.2%), *Trichophoromyia reburra* (2.2%), *Micropygomyia cayennensis* (1.5%).

Tabla 7. Abundancia de especies de flebotomos colectados en la Provincia de Chimborazo.

CHIMBORAZO-CUMANDÁ						
Época de colecta						
Especie	Seca		Lluviosa		Total	
	Abundancia absoluta	Abundancia relativa	Abundancia absoluta	Abundancia relativa	Abundancia absoluta	Abundancia relativa
<i>Pressatia dysponeta</i>	4	57,1%	29	43,9%	33	45,2%
<i>Psychodopygus panamensis</i>	0	0,0%	3	4,5%	3	4,1%
<i>Trichophoromyia reburra</i>	1	14,3%	2	3,0%	3	4,1%
<i>Lutzomyia sp.</i>	2	28,6%	25	37,9%	27	37,0%
<i>Pressatia sp.</i>	0	0,0%	7	10,6%	7	9,6%

Nota: Los datos muestran la abundancia de especies de hembras flebotomos con ingesta sanguínea en la localidad de Cumandá dividida por épocas de colecta.

Dentro de la localidad de Cumandá (Tabla 7), la especie con mayor abundancia relativa en las dos colectas realizadas fue *Pressatia dysponeta*, con un total de 33 individuos (45,2%), con un aumento en su densidad en la época lluviosa. También tenemos a *Psychodopygus panamensis* con 3 individuos (4,5%) en la época lluviosa y *Trichophoromyia reburra* que lo encontramos en las dos épocas, aumentando su densidad en la época lluviosa sumando un total de 3 individuos (4,5%).

Tabla 8. Abundancia de especies de flebótomos colectados en la Provincia de Esmeraldas.

ESMERALDAS-LAGARTO						
Época de colecta						
Especie	Seca		Lluviosa		Total	
	Abundancia absoluta	Abundancia relativa	Abundancia absoluta	Abundancia relativa	Abundancia absoluta	Abundancia relativa
<i>Lutzomyia tortura</i>	0	0,0%	1	4,8%	1	1,6%
<i>Pressatia dysponeta</i>	31	57,1%	0	0,0%	31	49,2%
<i>Micropygomyia cayennensis</i>	0	0,0%	2	9,5%	2	3,2%
<i>Lutzomyia sp.</i>	10	40,5%	17	81,0%	27	42,9%
<i>Pressatia sp.</i>	1	2,4%	1	4,8%	2	3,2%

Nota: Los datos muestran la abundancia de especies de hembras flebótomos con ingesta sanguínea en la localidad de Lagarto dividida por épocas de colecta.

En Lagarto (Tabla 8), la especie con mayor abundancia relativa fue *Pressatia dysponeta*, con un total de 31 individuos (49,2%) en la época seca. Seguido de *Micropygomyia cayennensis* con 2 individuos (3,2%) en la época lluviosa y *Lutzomyia tortura* presente en la época lluviosa con 1 individuo (1,6%).

Al revisar la abundancia relativa y absoluta de *Pressatia dysponeta* en relación al sitio de colecta se notó que en la provincia de Chimborazo a partir de los 250 m el número de especímenes comienza a disminuir mientras se va alejando de la zona peri-domiciliar, de la misma manera, vemos que ocurre en Esmeraldas que los especímenes con ingesta sanguínea van disminuye conforme se va alejando el sitio de colecta de la zona peri-domiciliar (Figura 7).

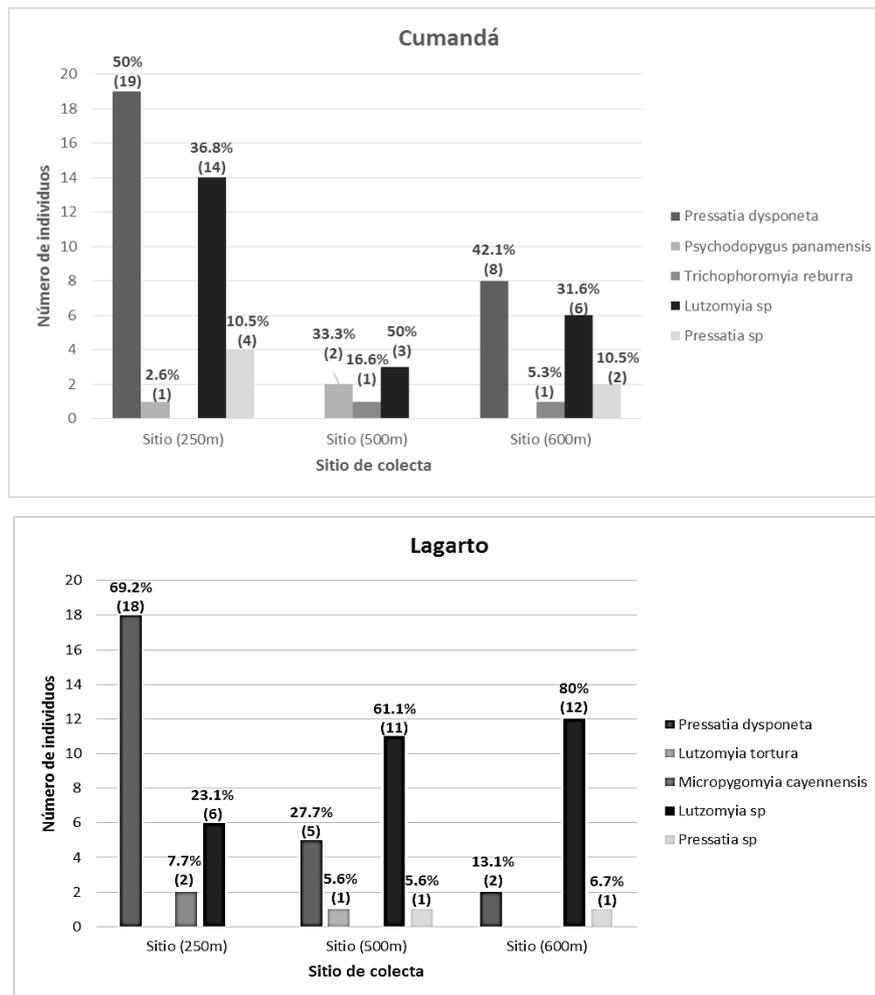


Figura 7. Distribución espacial de especies flebotomíneas colectadas.

a. Los datos muestran la distribución espacial de las diferentes especies de flebótomos con ingesta sanguínea en las localidades Cumandá y Lagarto.

Se colectó un total de 10892 flebótomos en las localidades de Lagarto y Cumandá. Se colectaron 7959 machos y 2983 hembras. De las cuales 2779 hembras fueron sin ingesta y 136 hembras con ingesta. Se registraron 18 hembras ovadas. Del total de hembras colectadas (n=2933), el 94.7% fueron hembras sin ingesta, el 4.6% hembras con ingesta y 0.6% hembras ovadas. De las cuales únicamente las hembras con ingesta fueron seleccionadas para su identificación morfológica y molecular.

En Cumandá en época seca se colectaron 393 hembras, el 83% fueron hembras sin ingestas, el 16,8% hembras con ingesta y 0.3% hembras ovadas. En la época lluviosa se colectaron 16 hembras, de las cuales el 43,75% fueron hembras sin ingesta, el 43,75% de hembras con ingesta y 12,5% de hembras ovadas (Figura 8).

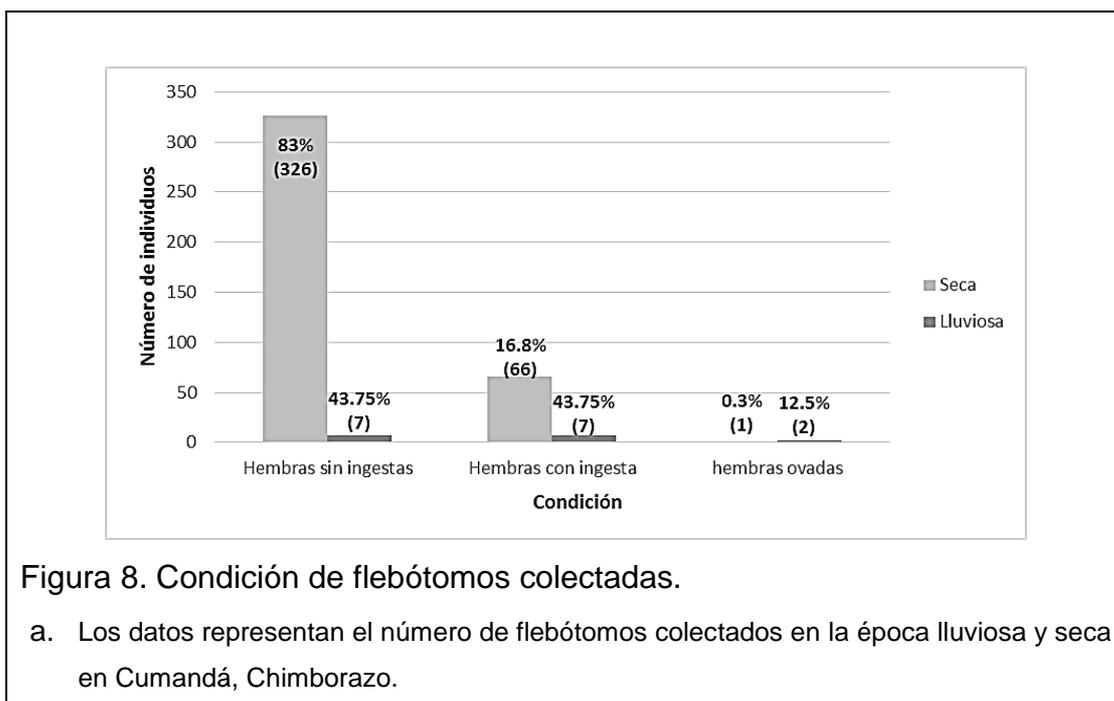


Figura 8. Condición de flebótomos colectadas.

- a. Los datos representan el número de flebótomos colectados en la época lluviosa y seca en Cumandá, Chimborazo.

En cambio, en Lagarto, se colectaron 93 hembras en la época seca, el 69,9% (65) eran hembras sin ingesta, el 22,6% (21) hembras con ingesta y 7.5% (7) hembras ovadas. En la época lluviosa se colectó un total de 2431 hembras, de las cuales el 97,9% (2381) eran hembras sin ingesta, el 1,7% (42) de hembras con ingesta y el 0,3% (8) de hembras ovadas (Figura 9).

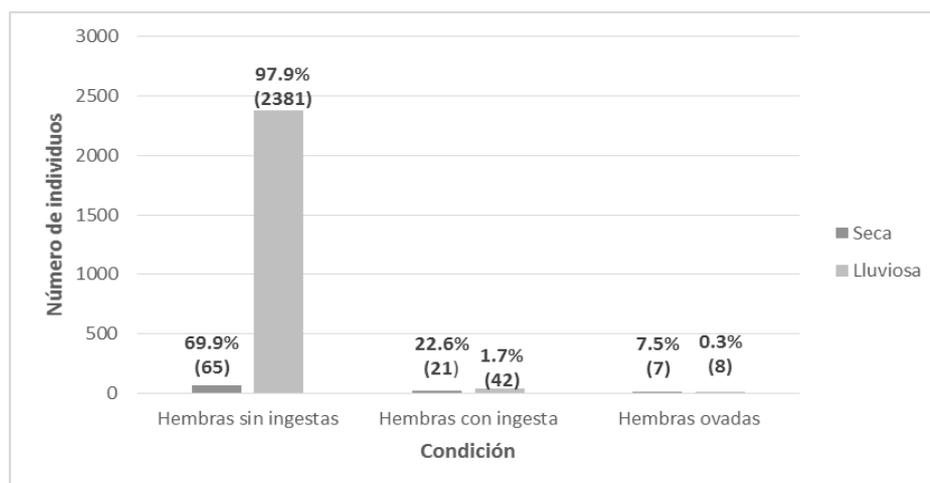


Figura 9. Condición de flebótomos colectadas.

- a. Los datos representan el número de flebótomos colectados en la época lluviosa y seca en Lagarto, Esmeraldas.

De acuerdo a la distribución espacio-temporal (Figura 10a) de los individuos sin ingesta y con ingesta, se puede observar que tanto en la época seca como lluviosa se colectó una mayor cantidad de individuos en las áreas más cercanas al área peri-domiciliar en comparación con las zonas cercanas al bosque. En Cumandá (Figura 10b), en la época seca, la colecta de individuos fue mayor en la zonas cercanas a la población pero, en la época lluviosa sucede todo lo contrario, disminuye la cantidad de individuos en el área peri-domiciliar y aumenta en las zonas cercanas al bosque. En Lagarto (Figura 10c), en la temporada seca, la colecta de individuos disminuye en la zona peri-domiciliar aumenta en las zonas cercanas al bosque pero, en la época lluviosa, la colecta de individuos aumento en zonas peri-domiciliar y disminuye en zonas cercanas al bosque.

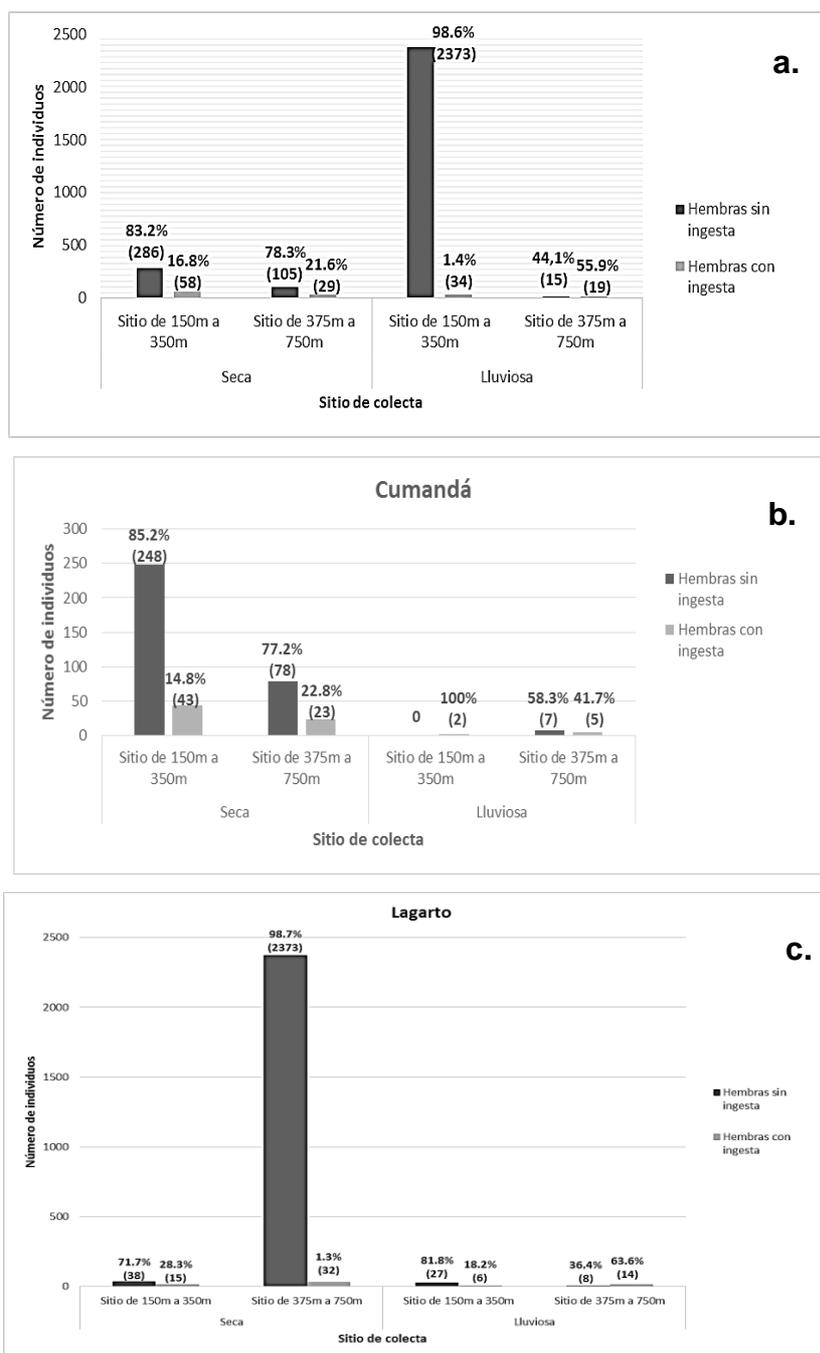


Figura 10. Distribución de hembras flebotomíneas en Esmeraldas y Chimborazo.

a) Distribución de hembras flebotomíneas en las zonas de colecta.

b) Hembras con ingesta y sin ingesta colectadas en época seca y lluviosa en Cumandá.

c) Hembras con ingesta y sin ingesta colectadas en época seca y lluviosa en Lagarto.

4.2 Detección de infección natural con *Leishmania* spp. de los flebótomos

Se utilizaron primers específicos para los parásitos del orden Trypanosomatidae para la detección de la presencia del parásito del género *Leishmania* dentro de hembras flebotomíneas con ingesta sanguínea (Figura 11). Para el ensayo se utilizaron todas las muestras de ADN extraídas (136). Los 63 individuos colectados con ingesta en la provincia de Esmeraldas, el 68,3% (43) de flebótomos presentaron infección con el parásito, mientras que el 31,7% (94) no presentaron el parásito. En la provincia de Chimborazo, de los 73 individuos colectados con ingesta sanguínea, el 28,8% (21) de flebótomos colectados presentan infección con el parásito mientras que el 71, 2% (64) no presentan el parásito.

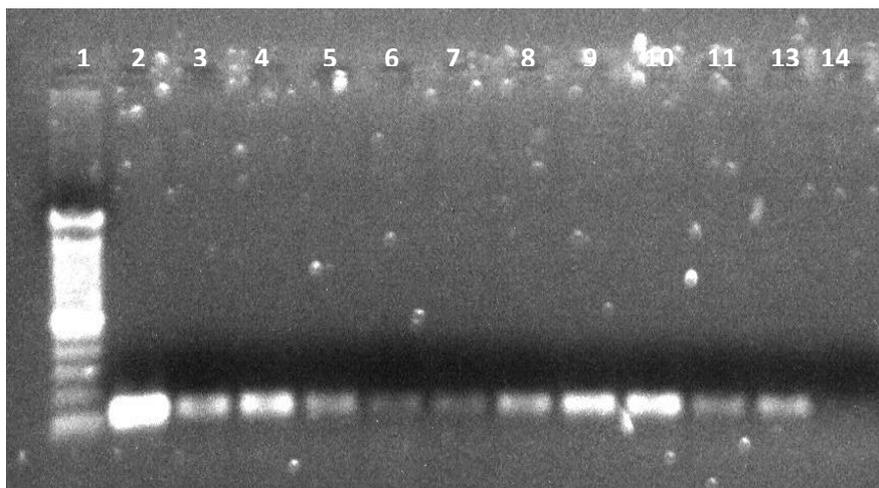


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa (5%) del gen mitocondrial citocromo B del orden galliforme (201 bp) de ADN de flebótomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR-multiplex.

a. La línea 1, marcador molecular 100bp; línea 2, control positivo (sangre de gallina); línea 3-13, ADN de flebótomos con ingesta sanguínea mamífera; línea 14, control negativo.

Si comparamos la distribución, espacio-temporal del parásito en las colectas se observa que en Cumandá, en la temporada seca, el número de flebótomos infectados fueron colectados en la misma cantidad (n=5) tanto en la zona peri-

domiciliar como en las zonas cercanas al bosque. Por otra parte, a pesar de que existió colecta de individuos en la época lluviosa, no existieron especies infectadas (Figura 12). En la localidad de Lagarto, en la época seca, se observó infección tanto en el área peri-domiciliar como en las zonas cercanas al bosque, pero se observó un aumento en la temporada lluviosa, donde los individuos infectados estaban cerca al área peri-domiciliar (Figura 13).

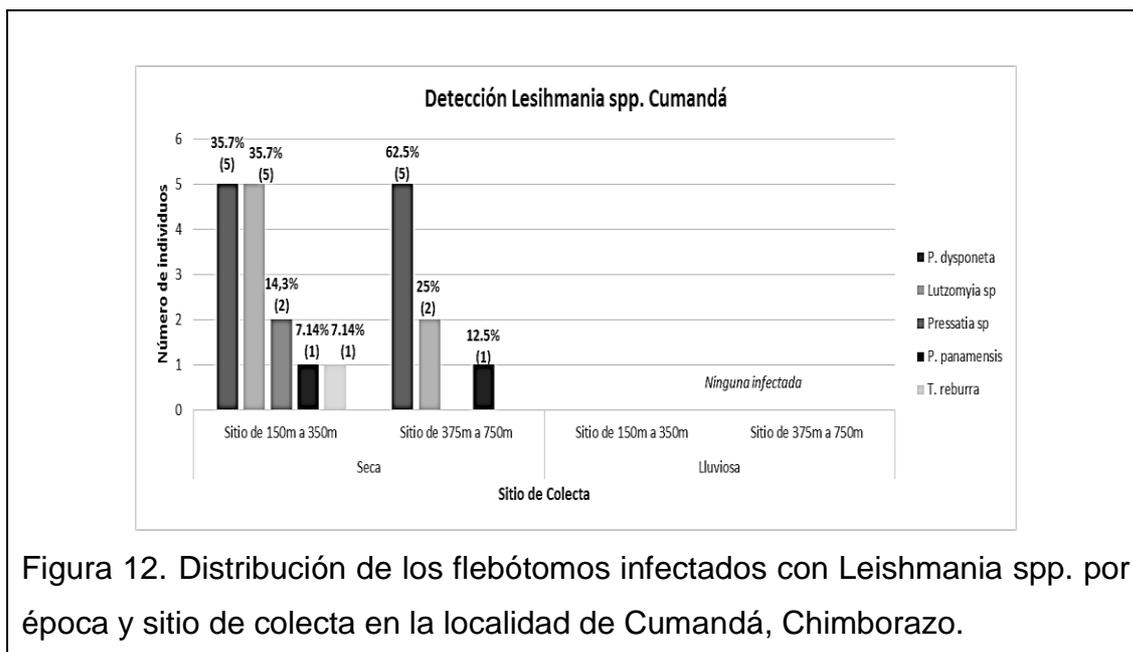


Figura 12. Distribución de los flebótomos infectados con Leishmania spp. por época y sitio de colecta en la localidad de Cumandá, Chimborazo.

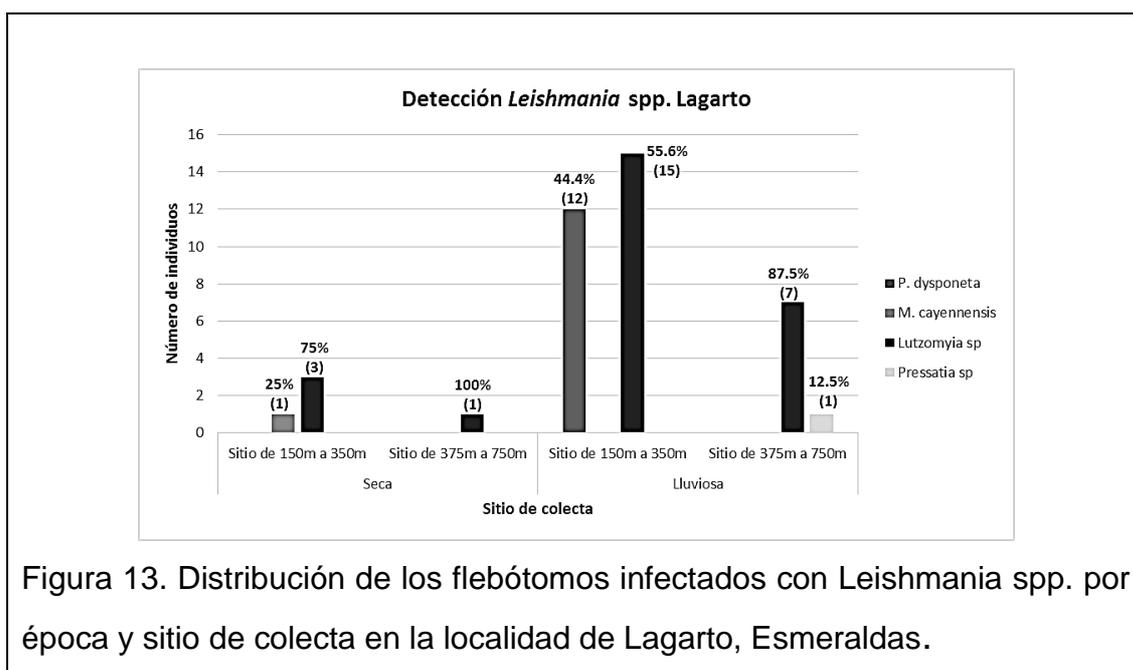
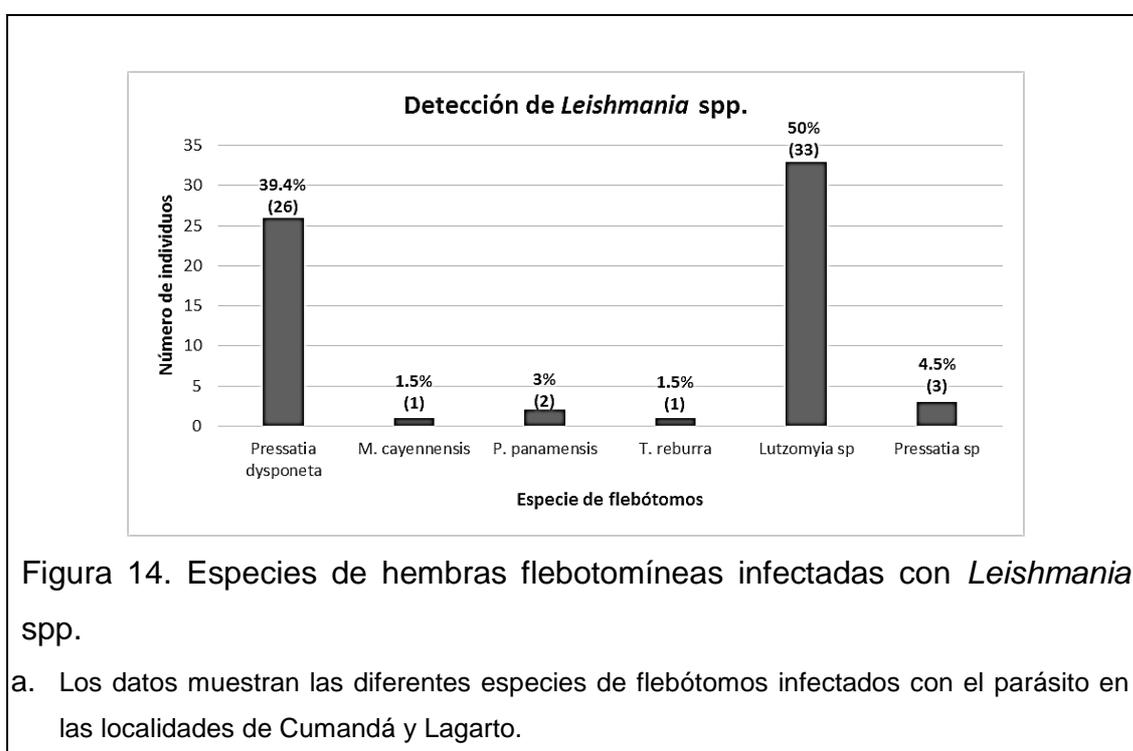


Figura 13. Distribución de los flebótomos infectados con Leishmania spp. por época y sitio de colecta en la localidad de Lagarto, Esmeraldas.

Cuatro de las cinco especies de flebótomos presentaron infección natural con *Leishmania* spp.: *Pressatia dysponeta*, *Psychodopygus panamensis*, *Trichophoromyia reburra* y *Micropygomyia cayennensis*. La especie con mayor infección fue *Pressatia dysponeta* (39.4%), sin tomar en cuenta a *Lutzomyia* sp. que es un grupo de individuos que no se pudo identificar taxonómicamente pero que también presentaron infección natural con el parásito. La única especie identificada que no presentó infección fue *Lutzomyia tortura* (Figura 14).



4.3 Determinación de las fuentes alimenticias de los flebótomos

Se realizó la extracción de ADN de 136 hembras con ingesta sanguínea para la identificación de fuentes potenciales de alimentación de individuos flebotomíneos. Después se realizó la amplificación de fragmentos correspondientes al subphylum Vertebrata, con el objetivo de medir la efectividad del método de extracción. De las 136 muestras con ADN extraído, todas las muestras amplificaron para el tamaño del fragmento esperado (358 bp) (Figura 15).

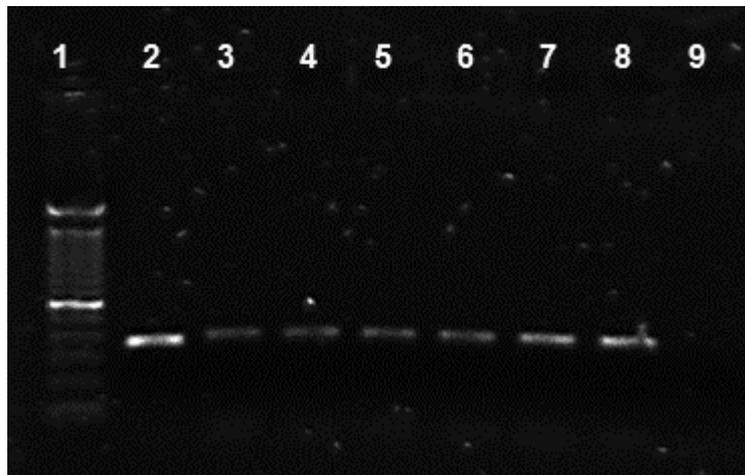


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa (5%) del gen mitocondrial citocromo B de vertebrados muestra fragmentos (358bp) de ADN de flebótomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR.

- a. La línea 1, marcador molecular 100bp; línea 2, control positivo (sangre humana) línea 3-8, ADN de flebótomos con ingesta sanguínea vertebrada; línea 9, control negativo.

Posteriormente, para la determinación de los animales de los cuales se alimentó el vector se utilizaron primers específicos para la clase Mammalia (Figura 16). En este proceso se evaluó el gen nuclear prepronociceptina (PNOC), específico para mamíferos.

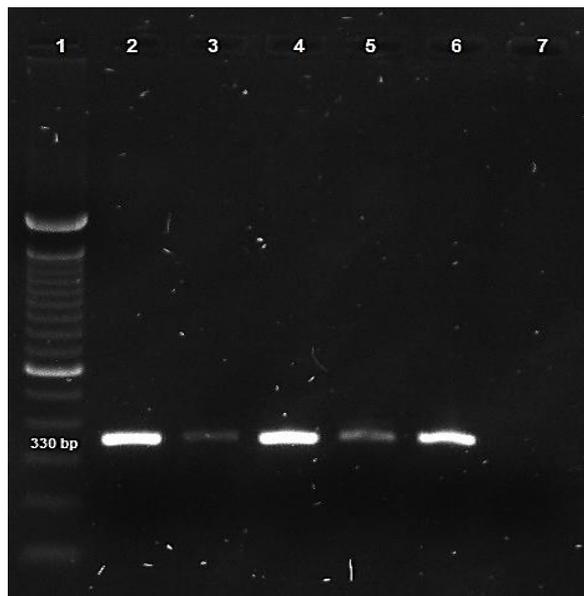


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa (5%) del gen mitocondrial citocromo B de mamíferos muestra fragmentos (330bp) de ADN de flebótomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR.

- a. La línea 1, marcador molecular 100bp; línea 2, control positivo (sangre humana) línea 3-6, ADN de flebótomos con ingesta sanguínea mamífera; línea 7, control negativo.

Con el protocolo estandarizado para la amplificación del gen PNOG, se analizaron 136 muestras positivas para vertebrados, 73 individuos corresponden a la provincia de Chimborazo y 63 a la provincia de Esmeraldas. Los datos obtenidos indican que 35.6% (n=26) fueron positivos para mamíferos de los individuos de la provincia de Chimborazo y 38.09% (n=24) fueron positivos para mamíferos de los individuos de la provincia de Esmeraldas.

Las muestras que dieron positivas para mamíferos fueron seleccionadas para la técnica de PCR-multiplex. Esta técnica permitió la identificación de importantes reservorios epidemiológicos del parásito y a su vez las fuentes de alimentación del vector. La Figura 17, muestra la amplificación específica del gen citocromo B para vaca (561 bp), perro (680 bp), humano (334 bp), cabra (132 bp) y cerdo (453 bp). Además, la Figura 18, muestra la amplificación del gen del citocromo B del orden galliforme (210 bp).

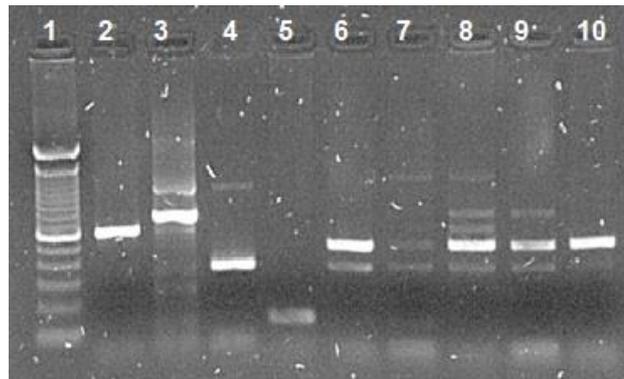


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa (5%) del gen mitocondrial citocromo B de vaca, perro, humano, cabra y cerdo de ADN de flebótomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR-multiplex.

- a. La línea 1, marcador molecular 100bp; línea 2-6, control positivo (sangre de vaca, perro, humano, cabra y cerdo) línea 7-10, ADN de flebótomos con ingesta sanguínea mamífera.

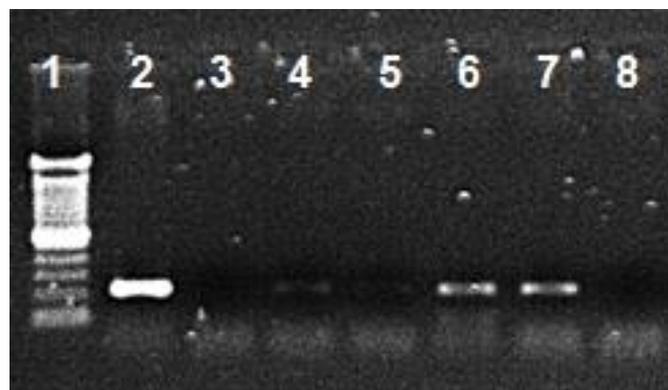
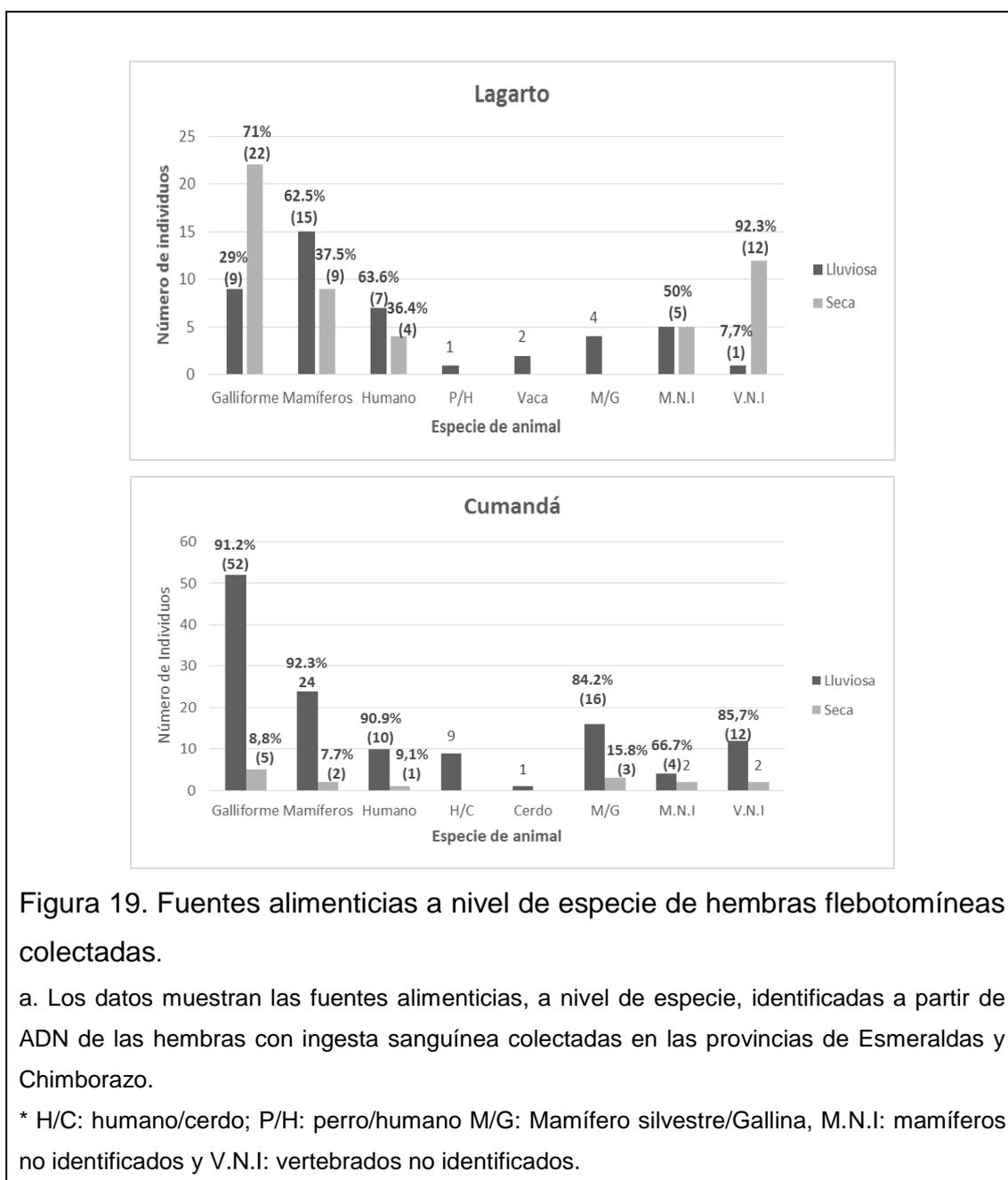


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa (5%) del gen mitocondrial citocromo B del orden galliforme (201 bp) de ADN de flebótomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR-multiplex.

- a. La línea 1, marcador molecular 100bp; línea 2, control positivo (sangre de gallina); línea 3-7, ADN de flebótomos con ingesta sanguínea mamífera; línea 8, control negativo.

Los datos obtenidos después del análisis molecular dieron como resultado que las fuentes de ingesta sanguínea para los vectores de leishmaniasis fueron la gallina (*Gallus gallus*) (n=31), humano (*Homo sapiens*) (n=11), vaca (*Bos*

taurus) (n=2) en el caso de la provincia de Esmeraldas. En cambio, en Chimborazo las fuentes de ingesta fueron gallina (*Gallus gallus*) (n=57); humano (*Homo sapiens*) (n=11); cerdo (*Sus scrofa*) (n=1). También, se encontraron tres tipos de ingestas mixtas: Gallina-mamífero silvestre, perro-humano y cerdo-humano. En Esmeraldas, gallina-mamífero silvestre (n=4) y perro-humano (n=1). En Chimborazo, gallina-mamífero silvestre (n=18) y cerdo-humano (n=9) (Figura 19).



Un grupo de muestras de ADN no se pudo identificar la fuente de la ingesta a nivel de especie y se le asignó el nombre de vertebrados no identificados (VNI). Los mamíferos no identificados (MNI) son todos aquellos individuos que únicamente dieron positivo para mamíferos pero no dieron resultados positivos en la PCR-multiplex.

Las frecuencias de las ingestas en relación a las especie de flebótomos identificados. *Gallus gallus* fue la fuente de alimentación del mayor número *Pressatia dysponeta*, *Psychodopygus panamensis* y *Trichophoromyia reburra*. También, se pudo detectar ingestas mixtas en *Pressatia dysponeta* y *Psychodopygus panamensis*, las cuales tienen en común ingestas con *Gallus gallus* (Tabla 9).

Pressatia dysponeta, fue la especie más común, y también presenta una mayor diversidad alimenticia. Sus ingestas registradas fueron de gallina, humano, cerdo y mamíferos silvestres.

Tabla 9. Fuentes alimenticias de hembras flebotomíneas infectadas con *Leishmania* spp. colectadas en las provincias de Esmeraldas y Chimborazo.

HOSPEDERO	ESPECIE DEL FLEBÓTOMO
Gallina (<i>Gallus gallus</i>)	<i>Pressatia dysponeta</i> (9), <i>Psychodopygus panamensis</i> (2), <i>Trichophoromyia reburra</i> (1)
Humano (<i>Homo sapiens</i>)	<i>Psychodopygus panamensis</i> (1),
Mamífero silvestre	<i>Pressatia dysponeta</i> (8), <i>Psychodopygus panamensis</i> (1), <i>Micropygomyia cayennensis</i> (1)
Humano/cerdo	<i>Pressatia dysponeta</i> (2)
Gallina/mamífero silvestre	<i>Pressatia dysponeta</i> (2), <i>Psychodopygus panamensis</i> (1),

Pressatia dysponeta y *Psychodopygus panamensis* presentaron antropofilia (Tabla 10). El índice de antropofilia de los flebótomos en Cumandá fue 27.4% (20/73) y en Lagarto 18.2% (12/66).

Capítulo V. Discusión

5.1 Composición taxonómica de flebotomos

Las técnicas moleculares están siendo utilizadas para fortalecer las debilidades de las técnicas morfológicas, pero muchos investigadores manifiestan que los datos generados molecularmente no son suficientes para la determinación del nivel taxonómico de una especie, por el contrario, científicos manifiestan que los datos morfológicos no brindan información importante (Hillis, Moritz, Mable, y Olmstead, 1996). Sin embargo, las diferencias que existen en un individuo a nivel morfológico son dadas por las diferencias que existen en sus genes. Entonces, si un individuo es identificado a nivel molecular, ese resultado debe coincidir con la identificación morfológica.

Con este criterio, en este estudio se identificaron cinco especies de flebotomos en las dos localidades estudiadas: *Lutzomyia tortura*, *Pressatia dysponeta*, *Psychodopygus panamensis*, *Trichophoromyia reburra* y *Micropygomyia cayennensis* cada una de estas especies se ha reportado en el país en diferentes provincias.

Lutzomyia tortura (Young y Rogers), esta especie fue colectada en la localidad de Lagarto, Esmeraldas. Trabajos anteriores reportan a *L. tortura* en las provincias de Esmeraldas, Orellana, Morona Santiago, Pastaza (Alexander, Takaoka, Eshita, Gomez, y Hashighuchi, 1992; Gomez, Kato, y Hashiguchi, 2014; Jones et al., 2010) En Esmeraldas, los reportes no poseen localidades específicas de colecta por lo que podríamos asegurar como localidad de colecta de *L. tortura* a Lagarto.

Pressatia dysponeta (Fairchild y Hertig), esta especie ha sido colectada en las provincias de Chimborazo, Esmeraldas, Cañar, Azuay, Bolívar, El Oro, Guayas, Imbabura. Los reportes muestran que es una especie de amplia distribución, además en la localidad de Cumandá ya ha sido reportada (Hashiguchi et al.,

2014). *Psychodopygus panamensis* (Shannon) ha sido reportada en las provincias de Bolívar, Cañar, Chimborazo, Esmeraldas, Guayas, Imbabura, Manabí, Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas (Alexander et al., 1992; Gomez et al., 2014; Hashiguchi et al., 2014). Nuestro reporte amplía la distribución de esta especie.

Trichophoromyia reburra (Fairchild y Hertig) ha sido reportada en Bolívar, Cañar, El Oro, Esmeraldas, Imbabura, Manabí y Pichincha (Alexander et al., 1992; Gomez et al., 2014; Jones et al., 2010; Zapata, Mejia, et al., 2012). En Cumandá es el primer reporte. *Micropygomyia cayennensis* (Floch y Abonnenc) ha sido colectada en El Oro, Loja, Los Ríos y Manabí (Alexander et al., 1992). En este estudio la reporta por primera vez en Lagarto y Cumandá.

La diversidad y abundancia de especies encontradas en las dos provincias está asociada con la diversidad de los hábitats y con las áreas específicas de colecta que incluyeron las zonas domiciliar, peri-domiciliar y bosque.

El uso de trampas CDC ha sido de utilidad en las capturas de flebotomíneas. Esta técnica descrita por Bruce Alexander (2000) ha sido utilizada ampliamente en estudios sobre flebotomos, por lo que los resultados pueden ser comparables. Esta técnica describe la colección de un mayor número de hembras flebotomíneas debido a que el crecimiento de la población y su eficacia biológica va a depender del mayor número de hembras que exista (Valderrama, Tavares, Dilermando, y Andrade Filho, 2011). En este estudio se recolectaron 2933 hembras flebotomíneas y 7959 machos. Esta variación, puede ser consecuencia de un mayor fototropismo de los machos, debido a que la colecta coincidió con la fase de luna llena. En Etiopía, se demostró que la eficacia de atracción y captura en trampas CDC es mayor por la presencia de la luna, sobretudo en luna llena (mayor cantidad de luz), al utilizar la variación de la luz que tiene cada fase lunar con la diferencia de fototropismo (mayor o menor) que tiene cada especie se podría predecir la cantidad de individuos en cada colecta (Valderrama et al., 2011). Otra explicación para

entender mejor la mayor cantidad de individuos macho en nuestras capturas es la liberación de feromonas por parte de las hembras que provoca que la actividad de los flebótomos machos aumente con el fin de garantizar la copula y mantener la especie (Marins de Aguiar, Muniz de Medeiros, Santos De Marco, Corrêa dos Santos, y Gambardella, 1996).

Cada temporada presentó diferente distribución espacio-temporal. En Cumandá se observó que en temporada seca la colecta de individuos fue mayor en las zonas cercanas a la población, pero en la época lluviosa disminuye la cantidad de individuos en el área peri-domiciliar y aumenta en las zonas cercanas al bosque. En Lagarto, en la temporada seca, se observa que la colecta de individuos disminuye en la zona peri-domiciliar y aumenta en las zonas cercanas al bosque, mientras que en la época lluviosa la colecta de individuos aumento en zonas peri-domiciliares y disminuyó en zonas cercanas al bosque. Esta variación, pudo haber sido consecuencia de la temperatura y humedad relativa del lugar de colecta, factores que influyen en el desarrollo y actividad del vector (Perez et al., 2014). Además, estos resultados muestran un alto riesgo de transmisión de enfermedades, ya que la distribución espacial del vector se está acercando a las zonas habitadas. La cercanía de los flebótomos a zonas pobladas es por la facilidad de alimento que poseen, la crianza de ganado vacuno, bovino, porcino y animales domesticados atraen a las especies zoofílicas de flebótomos (Kato et al., 2007). En Panamá, se identificaron a especies de flebótomos en lugares donde había presencia de animales domésticos (Calzada et al., 2015).

5.2 Detección de infección natural con *Leishmaniasis* spp. de los flebótomos

Del total de 136 muestras amplificadas para el gen del minicírculo de los tripanosomátidos, el 47% presentó infecciones naturales. La tasa de infección se encuentra alrededor 1,09% de acuerdo a reportes anteriores (Gomez et al., 2014; Zapata, Mejia, et al., 2012). Existen reportes que muestran que en zonas

bajas la tasa de infección es mayor a la que se puede encontrar en zonas andinas (Kato et al., 2005), lo que corroboraría nuestros resultados ya que la mayor tasa de infección se encontró en Lagarto, Esmeraldas.

En contraste, con los estudios antes mencionados, esta investigación se basa en la determinación de infección natural de flebótomos con ingesta sanguínea, descartando hembras sin ingesta, las cuales fueron colectadas en mayor cantidad. Además, la incriminación del vector con el parásito es un factor importante en el aumento o disminución de la tasa de infección, se ha observado que la mosca se alimenta del hombre o del algún reservorio animal, para que el parásito pueda desarrollarse, solo así la mosca será capaz de transmitir el parásito por medio de picadura (Killick-Kendrick, 1999), es así como apoyaríamos nuestra elección de hembras con ingesta, sin embargo esto no descarta la infección previa de aquellas sin ingesta sanguínea.

De las cinco especies de flebótomos identificadas taxonómicamente, cuatro presentaron infección natural con *Leishmania* spp.: *Pressatia dysponeta*, *Psychodopygus panamensis*, *Trichophoromyia reburra*, *Micropygomyia cayennensis*. *Pressatia dysponeta* la especie con mayor infección (39.4%). La única especie identificada que no presentó infección fue *Lutzomyia tortura*.

Debido a la cercanía taxonómica de los géneros *Leishmania* y *Endotrypanum* podría darse una confusión en los resultados debido a la alta similitud genética y probada relación evolutiva (Cupillo, Moomen, y Grimaldi, 1998; Fernandes, Nelson, y Beverley, 1993). La única forma ideal para conocer las especies de *Leishmania* es a base de secuenciación, ya que los dos géneros poseen una relación muy cercana a la familia Trypanosomatidae (Kato et al., 2007; Zapata, Mejia, et al., 2012). Varios estudios corroboran esta teoría, Kato et al. (2007) encontró que el ADN del parásito encontrado dentro del abdomen de lutzomyias pertenecía a *Endotrypanum* y a su vez el muestreo fue realizado en zonas endémicas de leishmaniasis (Kato et al., 2007).

Hay que destacar también que los hospederos vertebrados que posee el género *Endotrypanum* son los perezosos (*Choeloeptes*, *Bradypus*) que son habitantes de los bosques neotropicales (Calvopiña, Armijos, y Hashiguchi, 2004; Valderrama et al., 2011). Sin embargo los muestreos fueron realizados en zonas endémicas pobladas y bosques cercanos, lo que hace poco probable que este hospedero este presente y por ende el parásito.

Los resultados de las fuentes de ingesta sanguínea muestran que las gallinas (*Gallus gallus*) es la principal fuente de alimentación (64.7%). La relación que le podemos dar a este resultado, lo podemos explicar con un estudio realizado por Margarete Martins dos Santos Afonso (2012), en este trabajo demuestran que a pesar de que *Gallus gallus* puede presentar infección con el parásito *Leishmania* pero con ausencia de síntomas (Afonso, Duarte, Miranda, Caranha, y Rangel, 2012). Esto indica que los criaderos de gallinas en estas localidades tienen un rol muy importante en el desarrollo epidemiológico de la enfermedad y que pueden convertirse en focos importantes de la misma.

5.3 Detección de fuentes alimentarias de los flebotomos

Para la determinación de las fuentes de alimentación de los flebotomos, el uso del marcador genético PNOG ha sido utilizado en varios estudios. En un estudio amplificó el 100% de las muestras mostrando que estas especies de flebotomos se alimentaban de mamíferos diferentes (Haouas et al., 2007). Según Ninio (2011), el uso de este marcador para la identificación de fuentes alimentarias posee el 100% de éxito.

En este trabajo el porcentaje de amplificación de DNA obtenido fue de 36.8% (50/136). Según la localidad, los datos obtenidos indican que 35.62% (n=26) dieron positivo para mamíferos de los individuos de la provincia de Chimborazo y 38.09% (n=24) salieron positivo para mamíferos de los individuos de la provincia de Esmeraldas. Estos resultados pueden deberse a que la sangre dentro del vector no es de origen mamífero, la cual sería la principal razón por

la que no todas las muestras amplificaron o que el tiempo de la sangre dentro del abdomen afectó la eficiencia de la amplificación del marcador ya que pudo estar degradada por agentes externos como temperatura, químicos que forman parte de la extracción, entre otras (Haouas et al., 2007; Oshaghi et al., 2005).

En forma general, los datos obtenidos después del análisis molecular de fuentes alimentarias dieron como resultado (Figura 19): gallina (*Gallus gallus*) (n=31); humano (*Homo sapiens*) (n=11); vaca (*Bos taurus*) (n=2) en Lagarto, Esmeraldas. En cambio en Chimborazo tenemos: gallina (*Gallus gallus*) (n=57); humano (*Homo sapiens*) (n=11); cerdo (*Sus scrofa domesticus*) (n=1). Se detectaron tres tipos de ingestas mixtas: Gallina-mamífero silvestre, perro-humano y cerdo-humano. De acuerdo a las localidades tenemos: en Esmeraldas, gallina-mamífero silvestre (n=4) y perro-humano (n=1). En Chimborazo, gallina-mamífero silvestre (n=18) y cerdo-humano (n=9).

Se observa que las fuentes alimentarias de flebótomos pueden variar de acuerdo a cada localidad y disponibilidad de los mismos (Lewis, 1974). Estudios en Perú demuestran que las vacas forman parte principal de la dieta flebotomínea y en Colombia tanto vacas como cerdos fueron las fuentes más comunes (Morrison, Ferro, y Tesh, 1993). Otros estudios registran la presencia abundante de flebótomos en lugares donde la crianza de animales de corral como vacas, cerdos, gallinas, etc., y también animales domésticos junto a las viviendas y zonas cercanas al bosque atraen a variedad de especies de flebótomos (Kato et al., 2007). Un estudio en la región andina utilizando métodos inmunológicos demostró que las muestras de las lutzomyias colectadas se alimentaron de mamíferos (Morrison et al., 1993).

La abundante ingesta aviar en los datos recolectados para esta investigación corroboran los datos obtenidos por Afonso et al. en Brasil, donde la principal fuente de alimentación es la aviar (Afonso et al., 2012). Además se afirma una vez más el comportamiento oportunista que poseen los flebótomos, ya que su alimentación se va a basar en la disponibilidad y abundancia de alimento

disponible (Abbasi et al., 2009; Chaves, Harrington, Keogh, Nguyen, y Kitron, 2010).

Pressatia dysponeta, *Psychodopygus panamensis* y *Trichophoromyia reburra* se alimentaron principalmente de las gallinas (*Gallus gallus*). También, se pudo detectar ingestas mixtas en *Pressatia dysponeta* y *Psychodopygus panamensis* que se alimentan de gallinas, humanos, cerdo y vacas. *Pressatia dysponeta* a más de ser la especie mayor colectada, también presenta una mayor diversidad alimenticia.

Un aspecto que se debe considerar para el manejo de la leishmaniasis es que en estas localidades de las cinco especies identificadas solamente dos son antropofílicas, *Pressatia dysponeta* y *Psychodopygus panamensis*. El índice de antropofilia de los flebótomos en Cumandá fue de 27.4% (20/73) y en Lagarto del 18.2% (12/66).

De las especies identificadas que presentan ingesta e identificación de sus fuentes alimenticias, *Psychodopygus panamensis* es una especie antropofílica ya registrada (Zapata, Mejía, et al., 2012). *Pressatia dysponeta* en nuestros resultados presenta antropofilia y la explicación más acertada que le podemos dar es la característica oportunista que presenta este flebótomo. Y a eso le podemos añadir la presencia de ingestas mixtas que confirma el comportamiento de selección aleatorio del vector y su vez un punto muy importante en la distribución del parásito (Afonso et al., 2012).

Pressatia dysponeta en otro estudio es citada como no antropofílica junto con *Trichophoromyia reburra*, *Psathyromyia aragoi* y *Lutzomyia coli* (Zapata, Mejía, et al., 2012).

Este estudio sobre las fuentes de alimentación de flebótomos, como vectores de leishmaniasis, contribuye con un mayor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad en el país. El manejo de las estrategias de control de la enfermedad puede ser eficiente considerando los datos de este estudio que

incluyen la detección de especies de vectores que transmiten enfermedades a humanos, su afinidad por sangre humana y la identificación de los hospederos que tiene el parásito (Afonso et al., 2012; Claborn, 2010).

Los resultados de este estudio permiten sugerir una relación entre *Pressatia dysponeta*, *Leishmania* spp. y las gallinas (*Gallus gallus*) permitirán futuros trabajos que complementen y aumenten la comprensión de la epidemiología de la enfermedad en Lagarto y Cumandá, así como también, mejoras en los sistemas de control en estas áreas.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

Se identificaron cinco especies de flebótomos en Cumandá (Chimborazo) y Lagarto (Esmeraldas) que amplían los registros de su distribución en el Ecuador (Alexander et al., 1992). Cumandá presentó mayor abundancia y diversidad de insectos. *Pressatia dysponeta*, *Psychodopygus panamensis*, *Trichophoromyia reburra* fueron comunes en Cumandá, mientras que en Lagarto las especies más comunes fueron *Pressatia dysponeta*, *Lutzomyia tortura* y *Micropygomyia cayennensis*.

La mayor cantidad de machos en las colectas realizadas puede deberse a fototropismo positivo que tiene cada especie o a la atracción por feromonas de las hembras. La mayor cantidad de hembras con ingesta y sin ingesta fueron colectadas en zona peri-domiciliar en Cumandá en la temporada seca. En Lagarto, las zonas cercanas al bosque fueron el lugar más propicio para la mayor captura de flebótomos con disminución en la temporada lluviosa. La especie más común fue *Pressatia dysponeta*.

El mayor número de hembras flebotomíneas colectadas con ingesta fueron de la especie *Pressatia dysponeta*. Gallinas y mamíferos silvestres no identificados fueron su principal fuente de alimentación. La presencia de ingestas mixtas nos confirma la conducta oportunista del vector.

El 47% de los flebótomos con ingesta sanguínea presentaron infección con el parásito. La principal fuente de alimentación fueron las gallinas. *Pressatia dysponeta* fue la especie que presentó una mayor frecuencia de infección. La única especie identificada que no presentó infección con el parásito fue *Lutzomyia tortura*. La mayor cantidad de flebótomos infectados con el parásito fueron colectados en las zonas peri-domiciliares en la época lluviosa, lo que

indicaría un mayor riesgo de transmisión del parásito a los seres humanos en esta época.

Los resultados que se presentan sobre la distribución del vector, biología y ecología aumentan el conocimiento necesario para el desarrollo de mapas de riesgo de la enfermedad y datos necesarios para el diseño de estrategias del control de esta enfermedad en el Ecuador.

6.2 RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de otros métodos de captura como: trampas cebo humano, trampas Shannon que permitan el aumento de la colección de individuos y así exista un aumento y diversidad de especies colectadas.

Se recomienda tomar en cuenta factores como temperatura, humedad relativa y fases lunares que son factores que pueden influir en el aumento o disminución de individuos en las colectas.

Se recomienda aumentar el número de colectas para así utilizar un método estadístico que permita aumentar la confiabilidad los datos y métodos utilizados.

Se recomienda aumentar el número de localidades de estudio para tener una mejor proyección de la distribución y epidemiología de la Leishmaniasis. Los estudios que se están haciendo hoy en día acerca de este tema están abarcando las provincias de Morona Santiago, Sucumbíos, Pichincha, Guayas y Manabí.

Se recomiendo utilizar métodos de secuenciación para la identificación de ingestas alimentarias y para la identificación específica de especies de *Leishmania*.

REFERENCIAS

- A.G.M.F, R., Dantas, J., da Silva, F.J., Cavalcante, F.G., da Silva, E.V., Bhatia-Dey, N., et al. (2014). Geographical and Environmental Variables of Leishmaniasis Transmission.
- Abbasi, I., Cunio, R.y Warburg, A. (2009). Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. *Vector Borne Zoonotic Dis.*
- Afonso, M.M., Duarte, R., Miranda, J.C., Caranha, L.y Rangel, E.F. (2012). Studies on the feeding habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of Aamerican visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *J Trop Med.*
- Alexander, B., Takaoka, H., Eshita, Y., Gomez, E.A.y Hashighuchi, Y. (1992). New records of phlebotomine sand flies (Diptera Psychodidae) from Ecuador.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., et al. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one.*
- Amóra, S.S., Bevilaqua, C.M., Feijó, F., Alves, N.D.y Maciel, M.d.V. (2009). Control of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. *Neotropical entomology.*
- Anaguano, D.F., Ponce, P., Baldeón, M.E., Santander, S.y Cevallos, V. (2015). Blood-meal identification in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Valle Hermoso, a high prevalence zone for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta tropica.*
- Armijos, R.X., Weigel, M., Izurieta, R., Racines, J., Zurita, C., Herrera, W., et al. (1997). The Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Subtropical Ecuador. *Tropical Medicine and International Health.*
- Calvopiña, M., Armijos, R.X.y Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador.

- Calvopiña, M., Loor, R., Lara, F., Zambrano, P.y Hashiguchi, Y. (2012). Prevalencia y formas clínicas de las Leishmaniasis en el noroccidente de la provincia de Pichincha–Ecuador. *Rev Fac Cien Med (Quito)*.
- Calvopiña, M., Martínez, L.y Hashiguchi, Y. (2013). Cutaneous leishmaniasis "chiclero's ulcer" in subtropical Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*.
- Calzada, J.E., Saldaña, A., Gonzalez, K., Rigg, C., Pineda, V., Santamaria, A.M., et al. (2015). Cutaneous Leishmaniasis in dogs: is high seroprevalence indicative of a reservoir role? *Parasitology*.
- Chang, M.C., Teng, H.J., Chen, C.F., Chen, Y.C.y Jeng, C.R. (2008). The resting sites and blood-meal sources of *Anopheles minimus* in Taiwan. *Malar J*.
- Chaves, L.F., Harrington, L.C., Keogh, C.L., Nguyen, A.M.y Kitron, U.D. (2010). Blood feeding patterns of mosquitoes: random or structured. *Front Zool*.
- Claborn, D.M. (2010). The biology and control of leishmaniasis vectors. *Journal of global infectious diseases*.
- Córdova, O., Vargas, F., Hashiguchi, Y., Kato, H.y Gómez, E. (2011). Identificación de especies de *Leishmania* en pacientes y flebotominos en áreas de transmisión en una región del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*.
- Cupillo, E., Moomen, H.y Grimaldi, J. (1998). Genetic diversity in natural population of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.
- Davies, C.R., Reithinger, R., Campbell-Lendrum, D., Feliciangeli, D., Borges, R.y Rodriguez, B. (2000). The Epidemiology and Control of Leishmaniasis in Andean Countries. *Cadernos de Saúde Pública*.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*.
- Dostálová, A.y Volf, P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*.
- Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2014). Datos Epidemiológicos de Enfermedades Tropicales en el Ecuador (D. N. d.

- V. Epidemiológica, Trans.). Guayaquil, Ecuador: Ministerio de Salud Pública.
- Fernandes, A.P., Nelson, K.y Beverley, S.M. (1993). Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Garcia-Rejon, J., Blitvich, B., Farfan-Ale, J., Loroño-Pino, M., Chi Chim, W., Flores-Flores, L., et al. (2010). Host-feeding preference of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, in Yucatan State, Mexico. *Insect Science*.
- Gomez, E.A., Kato, H.y Hashiguchi, Y. (2014). Man-biting sand fly species and natural infection with the *Leishmania* promastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. *Acta Trop*.
- Guamán, I.G., Armijos, M.A.y Mancheno, J.S. (2013). Leishmaniasis Cútanea. *Rev Med HJCA*.
- Haouas, N., Pesson, B., Boudabous, J., Dedet, J.P., Babba, H.y Ravel, C. (2007). Development of a Molecular Tool for the Identification of *Leishmania* Reservoir Hosts by Blood Meal Analysis in the Insect Vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg*.
- Hashiguchi, K., Velez, N.L., Kato, H., Criollo, F.H., Romero, A.D., Gomez, L.E., et al. (2014). Sand fly fauna (Diptera, pcyhodidae, phlebotominae) in different leishmaniasis-endemic areas of ecuador, surveyed using a newly named mini-shannon trap. *Trop Med Health*.
- Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K.y Olmstead, R.G. (1996). *Molecular systematics* (Vol. 23): Sinauer Associates Sunderland, MA.
- Hotez, P.J., Molyneux, D.H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Sachs, S.E., Sachs, J.D., et al. (2007). *Control of Neglected Tropical Diseases*. Nwe England Journal of Medicine.
- Jones, L.A., Cohnstaedt, L.W., Beati, L., Teran, R., Leon, R.y Munstermann, L.E. (2010). New Records of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from Ecuador.
- Kato, H., Uezato, H., Gomez, E.A., Terayama, Y., Calvopiña, M., Iwata, H., et al. (2007). Establishment of a Mass Screening Method of Sand Fly

- Vectors for Leishmania Infection by Molecular Biological Methods. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
- Kato, H., Uezato, H., KATAKURA, K., CALVOPIÑA, M., Marco, J.D., BARROSO, P., et al. (2005). Detection and identification of Leishmanias species within naturally infected in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*
- Kent, R.J.y Norris, D.E. (2005). Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *The American journal of tropical medicine and hygiene.*
- Kent, R.J.y Norris, D.E. (2005). Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.*
- Killick-Kendrick, R. (1999). *The Biology and Control of Phlebotomine Sandflies.* Clinics in dermatology.
- Lah, E.F.C., Ahamad, M., Haron, M.S.y Ming, H.T. (2012). Establishment of a molecular tool for blood meal identification in Malaysia. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine.*
- Lewis, D.J. (1974). The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. *Annual Review of Entomology.*
- Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, M., Javadian, E., Rassi, Y., Sadraei, J.y Mohtarami, F. (2009). Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays. *Arthropod-Borne Dis.*
- Marins de Aguiar, M., Muniz de Medeiros, W., Santos De Marco, T., Corrêa dos Santos, S.y Gambardella, S. (1996). *Ecologia dos flebotomíneos da Serra do Mar, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil.* Cad. Saúde Públ.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N.y Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol.*
- Morrison, A.C., Ferro, C.y Tesh, R.B. (1993). Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral

- leishmaniasis in Colombia. The American journal of tropical medicine and hygiene.
- Ngo, K.A.y Kramer, L.D. (2003). Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. Journal of Medical Entomology.
- Ngo, K.A.y Kramer, L.D. (2003). Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. J Med Entomol.
- Nicolas, L., Prina, E., Lang, T.y Milon, G. (2002). Real-Time PCR for Detection and Quantitation of Leishmania in Mousse Tissues. Journal of Clinical Microbiology.
- Nieves, E., Oraá, L., Rondón, Y., Sánchez, M., Sánchez, Y., Rujano, M., et al. (2014). Riesgo de transmisión de Leishmania (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Mérida Venezuela. Avances en Biomedicina.
- Ofelia, C., Vargas Franklin, Hashiguchi Yoshihisa, Kato Hirotomoy Eduardo, G. (2011). Identificación de especies Leishmania en pacientes y flebotominos en áreas de transmisión en una región del Perú.
- OPS, O.p.d.I.S.y OMS, O.m.d.I.s. (2015). Leishmaniasis: Epidemiological report of the Americas Report Leishmaniasis. Organización panamericana de la Salud.
- Organización Mundial de la Salud, O. (2010). Control de las leishmaniasis. Oshaghi, M.A., Chavshin, A.R., Vatandoost, H., Yaaghoobi, F., Mohtarami, F., Hashemzadeh, M., et al. (2005). Effects of Post Ingestion and Physical Conditions on PCR Amplification of Host Blood Meal DNA in Mosquitoes. Iranian J Publ Health.
- Palacios, J.y Ontaneda, G. (2013). Boletín Climatológico Anual Año 2012 (D. d. G. Meteorológica, Trans.) Estudios e Investigaciones Meteorológicas: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología.
- Perez, J., Virgen, A., Rojas, J.C., Rebollar-Tellez, E.A., Alfredo, C., Infante, F., et al. (2014). Species composition and seasonal abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coffee agroecosystems. Mem

Inst Oswaldo Cruz.

- Ready, P.D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol*.
- Salomón, O.D. (2009). Vectores de Leishmaniasis en las Américas. *Gazeta Médica da Bahia*.
- Sant'Anna, M.R., Diaz-Albiter, H., Aguiar-Martins, K., Al Salem, W.S., Cavalcante, R.R., Dillon, V.M., et al. (2014). Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasit Vectors*.
- Sant'Anna, M.R.V., Jones, N.G., Hindley, J.A., Mendes-Sousa, A.F., Dillon, R.J., Cavalcante, R.R., et al. (2008). Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta tropica*.
- Valderrama, A., Tavares, M.G., Dilermando, J.y Andrade Filho, J.D. (2011). Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(8).
- Young, D.G. y Duncan, M.A. (1994). Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sand Flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Dyptera: Psychodidae). Gainesville, Florida, USA: Associated Publishers.
- Zapata, S., Mejia, L., Le Pont, F., Leon, R., Pesson, B., Ravel, C., et al. (2012). A study of a population of *Nyssomyia traidoi* (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador. *Parasit Vectors*.

ANEXOS

ABREVIATURAS

spp.	Especies del género.
sp.	Especie de género
L.	Lutzomyia
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
µL	Micro litro.
RPM	Revoluciones por minuto.
bp	Pares de base.
msnm	Metros sobre el nivel del mar.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
CDC	Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades, USA.
NCBI	Centro Internacional para la Información Biotecnológica.
TBE	Tris Borato, EDTA