



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IDENTIFICACIÓN DE FUENTES ALIMENTARIAS DE LUTZOMYIA SPP.
LIGADAS A CASOS DE LEISHMANIASIS, MEDIANTE TÉCNICAS
MOLECULARES

AUTOR

Gustavo Eduardo Pérez Mejía

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IDENTIFICACIÓN DE FUENTES ALIMENTARIAS DE *LUTZOMYIA* SPP.
LIGADAS A CASOS DE LEISHMANIASIS, MEDIANTE TÉCNICAS
MOLECULARES

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

Profesor Guía

Patricio Rojas Silva, Ph.D.

Autor

Gustavo Eduardo Pérez Mejía

Año

2017

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”.

Patricio Rojas Silva

Doctor en Farmacognosia

C.I. 1714991062

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Fernando Xavier Rivas Romero

Magister en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

C.I. 1718092701

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTIFICO

Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos.

William Patricio Ponce Yaulema

Doctor en Filosofía

C.I. 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”.

Gustavo Pérez Mejía

C.I. 0401209614

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la sabiduría y paciencia para terminar este trabajo. A mi familia, especialmente a mi madre por su apoyo incondicional. A todo el personal del Centro de Investigación Traslacional, incluyendo a los Drs. Patricio Ponce, Patricio Rojas, Manuel Baldeón, como también a Ollala Barreiro y Erika Muñoz. A la Universidad de Las Américas y a todos los maestros por todas las enseñanzas y valores infundidos a través de toda mi formación profesional. Al ingeniero David Anaguano por ser un amigo y un mentor.

Un agradecimiento especial al Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial de Shell por el apoyo brindado en la salida de campo.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi abuelito José por todos los valores que supo inculcarme a lo largo de toda mi vida, siempre te extrañaré. A mi madre Elizabeth gracias por el amor que me ha brindado. A mi abuelita Olguita y mis tíos Tere, Silvana y Byron, gracias por todo el apoyo.

A mis amigos Alejita, Gaby, Xavier, Liz y Pao, por todos los años de amistad, risas y locuras.

A Lenny gracias por ser mi compañera y mi respaldo en todo este largo camino.

RESUMEN

La leishmaniasis es provocada por protozoarios del género *Leishmania*, y se transmite por la picadura de vectores dípteros hembras hematófagos, llamados flebótomos del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. En el presente trabajo de titulación se planteó la identificación de flebótomos, sus fuentes alimenticias y la presencia de parásitos de la familia Trypanosomatidae en áreas endémicas del Ecuador. Los flebótomos fueron colectados en las localidades de Progreso (Guayas), Calceta (Manabí), Shushufindi (Sucumbíos) y Shell (Pastaza) empleando trampas CDC de luz normal y ultravioleta. Las hembras alimentadas colectadas y montadas en medio permanente Bálsamo de Canadá y semipermanente Euparal permitió la identificación taxonómica de 7 géneros de flebótomos y 8 especies de *Lutzomyia* las cuales fueron *Helcocyrtomyia tortura*, *Micropygomyia cayennensis*, *Psychodopygus paraensis*, *Trichophoromyia napoensis*, *Nysomyia yuilli yuilli*, *Psychodopygus davisii*, *Evandromyia walkeri*, y *Trichophoromyia ubiquitalis*. En el caso de la especie *H. tortura* es la primera vez que se registra en la provincia del Guayas. El análisis para la identificación de fuentes alimentarias mediante la amplificación del gen citocromo B mitocondrial usando la técnica molecular de PCR, mostró que la mayor ingesta sanguínea corresponde a sangre humana en un 54%, seguida de sangre del orden galliforme en un 26%, de igual manera se registró ingesta sanguínea de cerdo, vaca, perro e ingesta doble de sangre humana y galliforme. De igual manera se realizó la identificación de infección natural por parásitos de la familia Trypanosomatidae mediante la amplificación de la región ITS1 y por secuenciación se logró identificar la presencia de *Leishmania* spp. y *L. mexicana*. Con los resultados obtenidos en la colecta se puede concluir, que para estudios de ingesta sanguínea de flebótomos, se puede usar tanto trampas de luz normal como luz ultravioleta, ya que en ambas se colectó un número similar de hembras alimentadas. Los resultados obtenidos ayudan a complementar información sobre el ciclo epidemiológico de la leishmaniasis en

sectores endémicos de la enfermedad, en donde nunca se ha realizado este tipo de estudios y así implementar estrategias de control y prevención.

ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by protozoan parasites from the genus *Leishmania*, and it is transmitted by the bite of dipterous female hematophagous vectors, called sand flies belonging to the genus *Phlebotomus* in the Old World and *Lutzomyia* in the New World. In the present project we posed the identification of sandflies, their food sources and the presence of parasites of the family Trypanosomatidae in Ecuadorian endemic areas. The sandflies were collected in the locations of Progreso (Guayas), Calceta (Manabí), Shushufindi (Sucumbíos) and Shell (Pastaza) using CDC traps of normal and ultraviolet type light. The taxonomic identification of the collected fed females, by plate mounting in permanent Canada Balsam medium and semipermanent Euparal, allowed the identification of 7 genera of sandflies and 8 species of *Lutzomyia* which were *Helcocyrtomyia tortura*, *Micropygomyia cayennensis*, *Psychodopygus paraensis*, *Trichophoromyia Napoensis*, *Nysomyia yuilli yuilli*, *Psychodopygus davisii*, *Evandromyia walkeri*, and *Trichophoromyia ubiquitalis*. In the case of the *H. tortura* species, it's the first time that it is recorded in the Guayas province. The analysis for the identification of dietary sources, by amplification of the mitochondrial cytochrome B gene using the molecular technique of PCR, showed that the highest blood intake corresponds to human blood with a 54%, followed by galliform blood with 26%: there was also recorded the blood ingestion from pig, cow, dog and double ingestion from human and galliform. Likewise, the identification of natural infection by parasites of the family Trypanosomatidae was performed by the amplification of the ITS1 region and by sequencing we were able to identify the presence of *Leishmania* spp. and *L. mexicana*. With the results obtained in the collection we concluded that for studies of blood intake in sandflies both traps (of normal light and ultraviolet light) can be used, as in both we collected a similar number of fed females. The results obtained help to complement information on the epidemiological cycle of leishmaniasis in endemic sectors where this type of studies has never been carried out and thus implement control and prevention strategies.

ÍNDICE

Capítulo I. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
1.4 Justificación.	4
Capítulo II. Marco Teórico	6
2.1 Leishmaniasis.....	6
2.1.1 Generalidades	6
2.1.2 Leishmaniasis en el mundo	6
2.1.3. Leishmaniasis en Ecuador.....	11
2.1.4 Leishmaniasis cutánea y mucocutánea	14
2.1.5 Ciclo biológico de la <i>Leishmania</i>	15
2.2 El vector	17
2.2.1 Morfología	18
2.2.2 Comportamiento	22
2.2.3 Reproducción.....	22
2.2.4 Ciclo biológico.....	23
2.2.5 Incriminación como vector	25
2.3 Hospedero.....	26
2.3.1 Identificación de la fuente alimenticia	28

Capítulo III. Diseño de Plan Experimental.....	30
Capítulo IV. Procedimiento para la obtención de datos	31
4.1 Población y muestra	31
4.1.1 Área de estudio.....	31
4.1.2 Colecta de flebotomos en campo	33
4.2 Materiales y métodos	35
4.2.1 Procesamiento de flebotomos	35
4.2.2 Montaje e identificación taxonómica de flebotomos.....	36
4.2.3 Extracción de ADN.....	37
4.2.4 Amplificación de ADN de ingesta sanguínea	38
4.2.4.1 Amplificación del gen <i>cytB</i> del ADN mitocondrial de vertebrados..	38
4.2.4.2 Amplificación del gen <i>cytB</i> del ADN mitocondrial de mamíferos domésticos.....	39
4.2.4.3 Amplificación del gen <i>cytB</i> del ADN mitocondrial de galliformes ...	41
4.2.5 Identificación de infección natural con <i>Leishmania</i> . spp.	41
4.2.6 Electroforesis en geles de agarosa.....	42
4.2.7 Secuenciación de ADN.....	43
CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
5.1 Colecta de flebotomos en campo.....	43
5.2 Identificación taxonómica de flebotomos	46
5.3 Identificación de las fuentes alimenticias de flebotomos.	48
5.4 Identificación de infección por <i>Leishmania</i> en flebotomos.....	55
5.5 Discusión	58
5.5.1 Colecta e identificación taxonómica de flebotomos	58
5.5.2 Identificación de fuentes alimenticias de flebotomos	60

5.5.3 Identificación de infección por <i>Leishmania</i> en flebótomos	63
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	65
6.1 Conclusiones	65
6.2 Recomendaciones	67
REFERENCIAS	68
ANEXOS	81

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Distribución de leishmaniasis cutánea en el mundo con relación a los nuevos casos reportados en el año 2013.	10
FIGURA 2. Distribución de leishmania por región y provincia con respecto el número de especies de leishmania identificados.	12
FIGURA 3. Número de casos reportados en 2015 de leishmaniasis en cada provincia.	13
FIGURA 4. Ciclo de vida de la Leishmania.	17
FIGURA 5. Morfología externa de Lutzomyia.	19
FIGURA 6. Morfología interna de Lutzomyia.	21
FIGURA 7. Apareamiento de Phebotomus perniciosus después de la ingesta sanguínea.	23
FIGURA 8. Ciclo biológico de flebótomos.	25
FIGURA 9. Diagrama de flujo del diseño experimental.	30
FIGURA 10. Mapa de las zonas de colecta en campo.	32
FIGURA 11. Trampa CDC de luz normal y trampa cdc de luz ultravioleta	33
FIGURA 12. Ubicación de trampas CDC en campo.	34
FIGURA 13. Hembra Lutzomyia alimentada	36
FIGURA 14. Trampa CDC de luz normal como con trampa CDC de luz ultravioleta.	45
FIGURA 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del fragmento del gen citocromo b de vertebrados con un tamaño de 358 pb.	48
FIGURA 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la PCR múltiple de fragmentos de cytb de adn mitocondrial de mamíferos domésticos y de humano.	49
FIGURA 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación del fragmento del gen cytb de ADN mitocondrial de galliformes.	50
FIGURA 18. Porcentaje de muestras positivas y negativas para ingesta sanguínea de flebótomos hembra colectados en Progreso.	52
FIGURA 19. Porcentaje de muestras positivas y negativas de ingesta sanguínea de flebótomos hembra alimentadas colectados en Calceta	53

FIGURA 20. Porcentaje de muestras positivas para ingesta sanguínea de flebótomos hembra alimentados colectados en la localidad de Shushufindi.....	54
FIGURA 21. Porcentaje de muestras positivas para ingesta sanguínea de flebótomos hembra alimentadas colectadas en la localidad de Shell	55
FIGURA 22. Electroforesis en gel de agarosa 1% de PCR para la amplificación del segmento ITS1 de trypanosomatidae, en muestras de ADN extraído de flebótomos hembras alimentadas.....	56

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Taxonomía del vector flebótomo	18
TABLA 2. Condiciones para la PCR de cytB para vertebrados	39
TABLA 3. Secuencias de primers para PCR rmultiplex y tamaño de fragmentos de cada amplicón	40
TABLA 4 . Concentración, volumen de reactivos y perfil térmico para PCR multiplex.....	40
TABLA 5. Condiciones de reacción para la amplificación del gen cytB de galliformes	41
TABLA 6. Condiciones de reacción de PCR para amplificación de segmentos ITS de Trypanosomatidae	42
TABLA 7. Sitios de colecta, número total de especies colectados y porcentaje de hembras alimentadas	44
TABLA 8. Número de individuos colectados divididos por tipo de trampa, sexo y estado alimenticio	45
TABLA 9. Especies identificadas de flebótomos.	46
TABLA 10. Especies identificadas por localidad	47
TABLA 11. Resultados y porcentajes de identificación de fuentes alimentarias	51
TABLA 12. Especies de parásitos identificados mediante secuenciación en cada localidadde muestreo	57
TABLA 13. Porcentaje de infección por Trypanosomatidae en flebótomos.....	57

Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes

La leishmaniasis se define como un conjunto de enfermedades parasitarias, cuya causa son protozoarios del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, del género *Leishmania* (González, Benito, García y Iglesias, 2009, pp. 298-300). Las manifestaciones clínicas dependen de factores como la especie del parásito, tamaño del inóculo y respuesta inmune del hospedero. Se transmite por la picadura de un vector díptero de la familia Psychodidae, género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Ngo & Kramer, 2003, pp. 215-222).

Hasta el momento se han descrito 21 especies de *Leishmania* causantes de la enfermedad, la cual puede tener tres formas clínicas principales que son la cutánea, mucocutánea y visceral, caracterizadas por lesiones en la piel, mucosas o vísceras respectivamente (Paternina, 2012). Según la Organización Mundial de la Salud, la forma más frecuente de la enfermedad es la cutánea y se produce en zonas expuestas del cuerpo, dejando cicatrices permanentes y en muchos casos puede generar discapacidad. América es la región donde se producen la mayoría de casos de leishmaniasis cutánea, seguida de países del Medio Oriente y Asia Central como Afganistán, Pakistán, Irán, Irak, Líbano y Siria. Por otro lado, la forma mucocutánea que se caracteriza por la destrucción parcial o total de las mucosas de la boca, nariz y garganta es predominante en regiones tropicales de América como Brasil, Bolivia y Perú, región donde se da el 90% de los casos. La leishmaniasis visceral puede ser mortal si no se trata, y se caracteriza por síntomas como fiebre, anemia e inflamación del hígado y bazo. Es endémica en Etiopía, Sudán, Sudán del Sur, India y en países de América como Brasil y Perú, registrándose aproximadamente 300.000 casos por año (Paternina, 2012).

De las tres formas de leishmaniasis, la forma cutánea y mucocutánea constituyen un serio problema de salud pública en Ecuador. El Ministerio de Salud Pública (MSP) ha reportado casos en 23 de las 24 provincias (excepto la provincia de Galápagos) con una media de 1537 casos anuales (2012) desde hace 15 años, y con una distribución geográfica que corresponde a zonas endémicas en las provincias de la Costa, Amazonía y valles de la Sierra.

Según Calvopiña *et al.* (2010, pp. 6-7) la distribución geográfica de la enfermedad está bien delimitada. La del vector y sus reservorios es poco conocida. Es por esta razón que se ha visto la aparición de nuevos casos en zonas consideradas libres de la enfermedad, debido principalmente a que el vector se adapta a las condiciones ecológicas creadas por el hombre y por la modificación del ciclo natural de transmisión del parásito.

Los vectores conocidos de *Leishmania* son insectos del orden Díptera, familia Psychodidae, subfamilia Phlebotomidae, correspondientes a los géneros *Phlebotomus* (Europa, Asia y África) y *Lutzomyia* (América) conocidos como flebótomos, moscas de arena o manta blanca. Su identificación está basada en su morfología debido a que tienen características como abundantes setas en todo el cuerpo, tamaño que es de 3 mm a 6 mm y se definen por tener sus alas en forma de “V” perpendiculares al tórax. Sus hábitos alimenticios son crepusculares, y en el caso de las hembras son hematófagas, lo que les ayuda a producir huevos. Las larvas crecen en lugares con materia orgánica en descomposición. Alrededor del mundo se han descrito cerca de 800 especies de flebótomos (Salomón, 2009, pp. 3-15). Debido a las múltiples variaciones morfológicas que presentan a nivel de espermátidas en hembras y terminales genitálicas en machos, el género *Lutzomyia* se ha organizado en varios subgéneros, grupos, series y complejos de especie. De esta manera se ha logrado clasificar alrededor de 450 especies de *Lutzomyia* identificadas en América (Bejarano, 2001, pp 182-91)

La distribución, tanto del vector como de la enfermedad, se ha ampliado en las zonas rurales de las tres regiones del Ecuador, siendo las zonas de mayor incidencia la región Costa y Oriente. Los principales grupos afectados son personas que habitan cerca de regiones de vegetación abundante como bosques o cultivos; con bajos ingresos económicos y poca accesibilidad a educación (Ministerio de Salud Pública, 2015).

Según Paternina (2012) los organismos de la clase Mammalia han sido identificados como los principales reservorios de *Leishmania*. Están involucradas 62 especies de mamíferos con el ciclo de transmisión del parásito. Sin embargo, la identificación de los reservorios resulta ser una tarea muy laboriosa debido a que, coleccionar muestras de toda la fauna involucrada es imposible por los largos periodos de captura, y por la dificultad de obtener un número representativo de muestras. Es importante conocer los reservorios silvestres de *Leishmania* para comprender el ciclo epidemiológico de la enfermedad, y una forma de acercarse a este conocimiento es identificando las fuentes de alimentación hematófagas de los vectores, es decir de qué animales se alimentan los flebótomos hembras (Paternina, 2012).

1.2 Planteamiento del problema

Siendo los reservorios animales una de las partes poco estudiadas del ciclo epidemiológico de la leishmaniasis, el estudio de los reservorios mediante la identificación de la fuente alimentaria de los flebótomos nos puede suministrar información acerca de la distribución de la *Leishmania* en un rango geográfico. Por tal motivo se ha desarrollado diversas técnicas para estudiar los comportamientos alimenticios de las hembras *Lutzomyia*, como es la observación directa en campo o en espacios confinados; o analizar el patrón de cristalización de la hemoglobina en el tracto digestivo del insecto vector (Paternina, 2012; Haouas *et al.*, 2007, pp. 1054-1059). No obstante, estos métodos presentan varias desventajas por el tiempo que involucra; porque

resultan ser poco específicos por la gran cantidad de reservorios; por los problemas de detección de los antígenos y la sensibilidad del proceso.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General.

Identificar los vertebrados que son fuentes alimentarias de los flebótomos y el estatus de infección con *Leishmania* mediante técnicas moleculares.

1.3.2 Objetivos Específicos.

Determinar las fuentes alimentarias de ingesta sanguínea de hembras alimentadas de *Lutzomyia* spp. mediante la técnica de PCR convencional y multiplex.

Determinar la presencia de *Leishmania* spp. en hembras alimentadas de *Lutzomyia* spp.

Identificar la diversidad de especies existentes del género *Lutzomyia* mediante montajes de individuos.

1.4 Justificación.

La leishmaniasis como enfermedad ha presentado casos en 23 de las 24 provincias del Ecuador principalmente en las regiones con clima tropical y subtropical que facilita la reproducción del vector (*Lutzomyia*), con alta incidencia en poblaciones cercanas a bosques y cultivos. Según los reportes del ministerio de Salud Pública del Ecuador, se ha reportado un incremento de casos en los últimos meses de 2015 y primer mes del 2016. La última gaceta epidemiológica (enero, 2016) publicada por el MSP indica la notificación de 19 casos nuevos, encontrándose la mayoría en las provincias de Pichicha y Santo Domingo (54% de los casos), con un total de 550 casos en lo que va del año. El principal grupo afectado es el de personas de entre 20 a 49 años de edad (MSP, 2015). A pesar de todos los estudios realizados en el país, existen

localidades en diferentes provincias en las que no se ha estudiado la distribución del vector ni del parásito.

Dentro del triángulo epidemiológico de la leishmaniasis, es decir parásitos, vectores y reservorios, estos últimos han sido los menos estudiados debido a la dificultad de muestreo de la fauna. Existen alrededor de 30 especies de flebótomos en América conocidos como vectores de *Leishmania*. En Ecuador han sido descritas 80 especies de *Lutzomyia* de los cuales 15 son antropofágicas, considerándolas como principales vectores de transmisión de *Leishmania* en humanos (Anaguano, *et al*, 2015, pp. 116-120). Del mismo modo, los vectores usan otras fuentes de alimentación animal, por lo tanto se encuentran relacionados de manera muy estrecha con animales utilizados para la ganadería, como son ganado vacuno, porcino y aves de corral. El estudio de las fuentes alimenticias del vector *Lutzomyia*, es importante para obtener información sobre el ciclo epidemiológico del parásito, es decir los posibles reservorios previos a la infección en humanos. Anteriormente el estudio de las fuentes alimenticias se realizaba por observación directa, lo cual representaba muchos recursos, sin embargo en esta década se empezaron a usar las herramientas moleculares para facilitar este tipo de estudios.

En el presente trabajo de titulación, se plantea es estudio de las fuentes alimentarias de especímenes *Lutzomyia* hembra, colectadas en diferentes localidades de la Costa y Oriente ecuatoriano en las que no se ha realizado un estudio previo similar.

Capítulo II. Marco Teórico

2.1 Leishmaniasis

2.1.1 Generalidades

La historia de la leishmaniasis proviene de finales de siglo XIX cuando algunos investigadores, entre ellos Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg y Vianna descubrieron el parásito en niños con anemia esplénica, al que se le denominó *Leishmania*. De ahí en adelante se identificaron diferentes especies del parásito en varias partes del mundo. Los estudios a lo largo del tiempo ubicaron al perro como reservorio natural principal, el siguiente paso en las investigaciones fue realizar cultivos en laboratorio. Progresivamente se fueron aclarando características tanto clínicas, geográficas y epidemiológicas de la enfermedad (Wheeler, Gluenz y Gull, 2011, pp. 647-662). En Ecuador y Perú se han encontrado cerámicas de la antigüedad donde se representaba las lesiones en forma de deformidades faciales, sin duda una muestra de la presencia de la enfermedad incluso en la época pre-colonial (Andrade y De la Cruz, 1999, pp. 135-147).

La leishmaniasis es una enfermedad parasítica, causada por el parásito intracelular obligado del género *Leishmania*, transmitido por la picadura de una hembra flebótomo infectada, que actúa como vector. Hasta el momento, 21 especies de *Leishmania* han sido identificadas como patógenas para los humanos. Esta enfermedad es prevalente principalmente en zonas tropicales y subtropicales en la mayoría de países alrededor del mundo (Gómez, Kato y Hashiguchi, 2014, pp. 41-49).

2.1.2 Leishmaniasis en el mundo

La leishmaniasis ha estado presente en todos los continentes del mundo a excepción de la Antártida. Siendo una enfermedad endémica de zonas tropicales y subtropicales, ha sido clasificada como una de las seis enfermedades endémicas más importantes (Andrade y De la Cruz, 1999, pp.

135-147). Se ha identificado su presencia principalmente en África, algunas zonas de Asia, Medio Oriente, América Latina y Mediterráneo. El tipo de enfermedad y la intensidad de la misma está condicionada con la distribución de la especie de *Leishmania* (Dawit, Girma y Simeneuw, 2013, pp. 1-7)

Según la Organización Mundial de la Salud, la leishmaniasis es una de las enfermedades más desatendidas, debido a que el principal grupo afectado es la gente de bajos recursos económicos que habitan en países en vías de desarrollo. Se ha calculado que 350 millones de personas están en riesgo de infectarse por el parásito, y se ha reportado cada año un total de 2 millones de casos nuevos. A pesar de ello, el poco avance en la investigación acerca de esta enfermedad, como de su ciclo epidemiológico, ha permitido el aumento de la tendencia mundial de la leishmaniasis, lo cual la vuelve un importante problema de salud pública (Organización Mundial de la Salud, 2010, pp. 5-20).

Los tres tipos principales de leishmaniasis: cutánea, mucocutánea y visceral, están presentes en todos los continentes del mundo, al igual que sus vectores (*Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo). En el caso de la leishmaniasis visceral provocada por *L. infantum*, se encuentra en zonas rurales de países mediterráneos, específicamente en lugares donde es favorable el desarrollo del vector, por lo general zonas periurbanas. Los vertebrados domesticados que habitan cerca de los humanos como perros y ganado atraen al vector, lo que facilita la transmisión. Es común encontrar personas con leishmaniasis cutánea y visceral en esta región, siendo más prevalente el tipo cutánea. La leishmaniasis visceral es un problema en países como Sudán, Somalia y Arabia Saudita (Ruiz, 2010, pp. 62-65).

El principal vector de leishmaniasis visceral es *Phlebotomus argentipes*. Habita en su mayor parte en los establos de ganado y en bajo número en los hogares humanos. Sin embargo, las costumbres de los habitantes como es dormir en el

suelo y fuera de la vivienda incrementa el riesgo de contagiarse del parásito (OMS, 2010, pp. 21-25).

Por su parte, en el continente Africano, la leishmaniasis visceral se transmite con distintos vectores con respecto a la distribución geográfica. En el sur de la sabana seca *P. orientalis* es el vector, mientras que en el bosque sur de la sabana *P. martini* y *P. celiae* transmiten la enfermedad. Se ha demostrado que los principales brotes de leishmaniasis en esta parte del mundo se deben al desplazamiento masivo de poblaciones de un lugar a otro; además de las condiciones sanitarias poco atendidas por los respectivos gobiernos. En la zona sur de la sabana, el riesgo de contagio está determinado por las condiciones de vivienda. La mayoría de hogares están fabricados con materiales vegetales en las cercanías de bosques; además las casas que están ubicadas cerca de montículos de termitas al parecer tienen un mayor riesgo de contagio (OMS, 2010, pp. 26-27).

La leishmaniasis cutánea en África presenta brotes en la zona altas de Etiopía y en otros países de África oriental. Las poblaciones asentadas a las riveras de ríos y en colinas rocosas tienen más contacto con el vector (OMS, 2015). En la mayor parte del Viejo Mundo, es decir parte de África y Europa, la forma predominante es la leishmaniasis cutánea. La introducción de proyectos agrícolas y el gran número de migrantes incrementan el riesgo de propagación de la enfermedad la cual es causada por *L. major* y *L. aethiopica* (OMS, 2010, pp. 5-9). Otra de las causas de propagación de la enfermedad son las constantes guerras internas que se viven en los países de Medio Oriente y África, cuya consecuencia directa es la migración de personas afectadas hacia países europeos (OMS, 2015).

En el Nuevo Mundo, las costumbres de la población son muy similares a la de la cuenca del mediterráneo, en otras palabras, la gente acostumbra vivir cerca de mascotas como perros, subsisten de la cría de animales de granja y

gallineros, lo que aumenta el riesgo de contraer la enfermedad. Por su parte, la leishmaniasis visceral en América es producida por *L. infantum* transmitida por el flebótomo *Lutzomyia longipalpis* (OMS, 2015). Adicionalmente, la leishmaniasis cutánea, debido a las múltiples especies de *Leishmania* que existen en una misma zona por las variaciones en los ciclos de transmisión, y la gran cantidad de reservorios, su epidemiología se ha vuelto muy compleja. Un factor de riesgo predominante para la transmisión de la enfermedad en América es el ámbito ocupacional del grupo afectado de personas. Ocupaciones como recolectores de caucho, militares, constructores y trabajadores de empresas agrícolas que se asientan en bosques tienen mucho contacto con el vector, de igual manera la deforestación ha provocado un aumento de los casos (OMS, 2010, pp. 5-11).

En el siguiente gráfico (figura 1) se muestra la distribución de casos nuevos de leishmaniasis cutánea reportados en todo el mundo de acuerdo al último estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud a finales del 2013. La mayoría de casos reportados están en África, Asia y Sudamérica en los siguientes países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, República Islámica de Irán, Paquistán, Perú y Arabia Saudita (OMS, 2015).

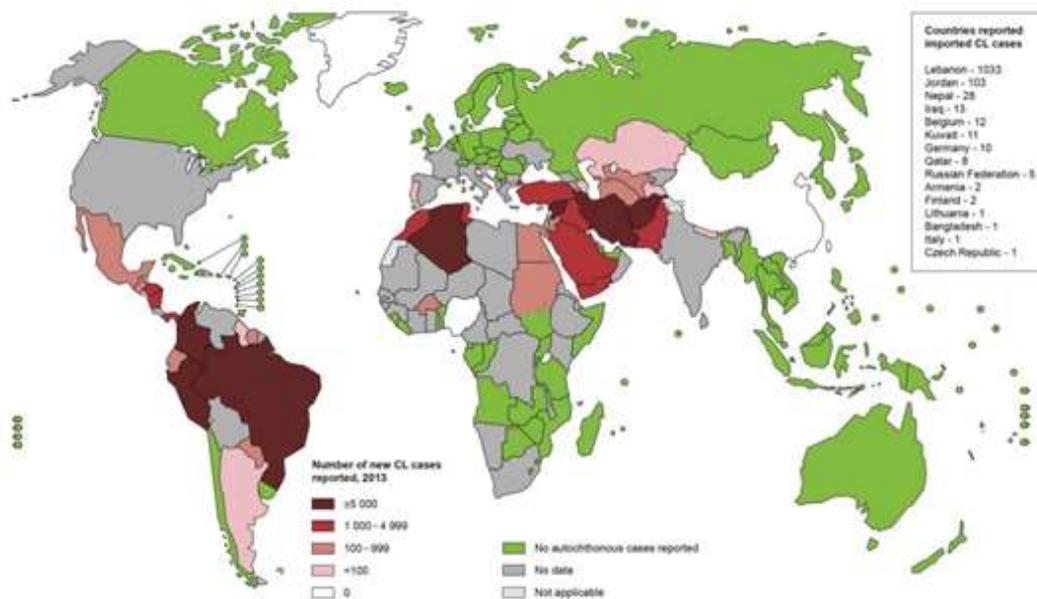


Figura 1. Distribución de leishmaniasis cutánea en el mundo con relación a los nuevos casos reportados en el año 2013. Tomado de Organización Mundial de la Salud, 2015.

En 2014 en América del Sur, según la Organización Panamericana de la Salud, hay un promedio de 51.098 nuevos casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en 16 de los 18 países en los cuales la enfermedad es endémica. Brasil, Colombia y Perú registraron el 75% de los casos, sin embargo la mayor incidencia está en países de Centro América como Nicaragua y Costa Rica (OMS, 2016).

En Ecuador solo se ha registrado la forma cutánea y mucocutánea de leishmaniasis. A pesar de no ser una forma mortal como es la visceral, su expansión geográfica ha provocado preocupación, principalmente por la falta de información de las comunidades más afectadas, ya que aún se usan métodos ancestrales para curar las llagas que provoca la enfermedad.

2.1.3. Leishmaniasis en Ecuador

De acuerdo a los registros arqueológicos, la leishmaniasis cutánea y mucocutánea han existido incluso hace cientos de años, antes de la llegada de los españoles (Calvopiña, Armijos y Hashiguchi 2004, pp. 663-672). No obstante, el primer caso clínico de leishmaniasis cutánea se reportó en 1920 en la provincia de Esmeraldas, en una zona cercana a la frontera con Colombia, mientras que el primer caso de la forma mucocutánea se registró en 1924. La forma visceral no ha sido reportada en el país, lo cual no significa que no puede estar presente. A partir de ello, se han registrado casos en las tres regiones del país, siendo la Costa la región con el mayor número de casos. Los problemas de comunicación y el precario sistema de salud existentes en la Amazonía hacen difícil la obtención de información en estas áreas (Olalla, *et al*, 2015, pp. 119-126).

Los casos de leishmaniasis cutánea han sido registrados en todas las provincias del país, a excepción de Galápagos. Los casos se han registrado desde el nivel del mar hasta los 2.700 msnm, la mayoría de ellos en áreas rurales. La distribución de la enfermedad muestra una tendencia estable en las tres regiones del país, con una media de 1.500 casos anuales. Por otro lado la distribución geográfica del vector y los reservorios han sido poco estudiados y el conocimiento de los mismos hasta el momento es escaso. Se cree que el calentamiento global estaría provocando la expansión del territorio del vector y por ende la aparición de nuevos casos (Calvopiña, 2010, pp. 6-7).

En Ecuador según los reportes de casos positivos recopilados durante varios años, circulan 7 especies de *Leishmania* que son: *Leishmania panamensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. major-like* y *L. naiffi*. El incremento de número de casos en los últimos años se ha dado principalmente en la región Costa. La causa principal ha sido el aumento de la actividad humana, como la construcción de viviendas en zonas selváticas,

provocando una alteración en el ciclo zoonótico de la leishmaniasis (Calvopiña, Armijos y Hashiguchi, 2004, pp. 663-672). Otra causa que incrementa el riesgo de enfermedades tropicales es la presencia de fenómenos meteorológicos como El Niño, aunque no hay mucha evidencia para asegurarlo. En 2004 Calvopiña y sus colaboradores (pp. 663-672) adjuntaron información sobre la distribución geográfica de las especies de *Leishmania* en las provincias del país. En la Figura 2 se muestran las especies de parásito y las provincias en las que se encuentran.

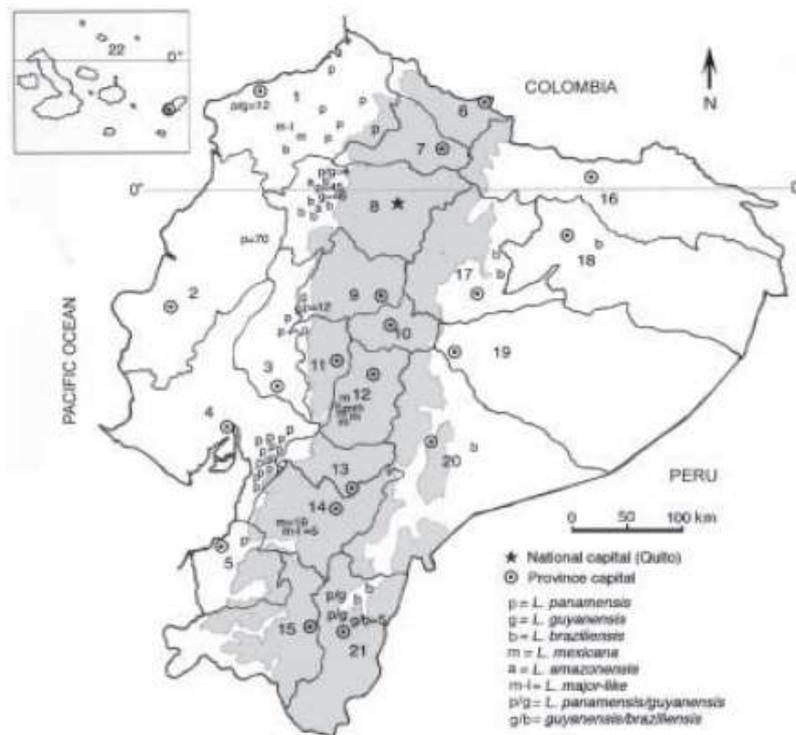


Figura 2. Distribución de leishmania por región y provincia con respecto al número de especies de leishmania identificados.
 Tomado de Calvopiña, Armijos y Hashiguchi. 2004, pp. 35

Como se indica en la Figura 2, las provincias de Galápagos y Carchi no presentaban especies del parásito registradas ni tampoco de la enfermedad, sin embargo en los últimos años se registraron casos en Carchi, dejando a Galápagos como la única provincia sin la presencia de la enfermedad (Arrivillaga, Ponce y Cevallos, 2013, p. 198)

El Ministerio de Salud Pública, en la gaceta epidemiológica N° 53 publicada el mes de enero del 2016, muestran un incremento de casos en el 2015 con respecto a años anteriores. En la semana epidemiológica 46 (del 15 al 21 de noviembre) se registró un total de 56 casos, siendo el registro más alto en tres años. El principal grupo afectado es el de personas con edades que comprende entre 20 y 49 años, es decir las personas que se encuentran en edades laborales que desempeñan trabajos agrícolas o actividades de recolección en bosques (MSP, 2016).

Número de casos de Leishmaniasis, por provincias y semana epidemiológica.

Provincia	Semana (grupo)		Total gene..
	SE 1 - 52	53	
PICHINCHA	332		332
SANTO DOMINGO DE LOS ..	207	7	214
ESMERALDAS	205	3	208
MORONA SANTIAGO	98	1	99
ORELLANA	94	2	96
PASTAZA	66		66
SUCUMBIOS	62		62
BOLIVAR	54		54
MANABI	49	3	52
NAPO	44	2	46
IMBABURA	39		39
EL ORO	34		34
GUAYAS	29		29
CHIMBORAZO	16		16
LOS RIOS	12		12
ZAMORA CHINCHIPE	11		11
COTOPAXI	7	1	8
LOJA	6		6
AZUAY	5		5
CARCHI	4		4
TUNGURAHUA	4		4
CAÑAR	2		2
SANTA ELENA	2		2
Total general	1.382	19	1.401

Número de casos de Leishmaniasis, por provincia.

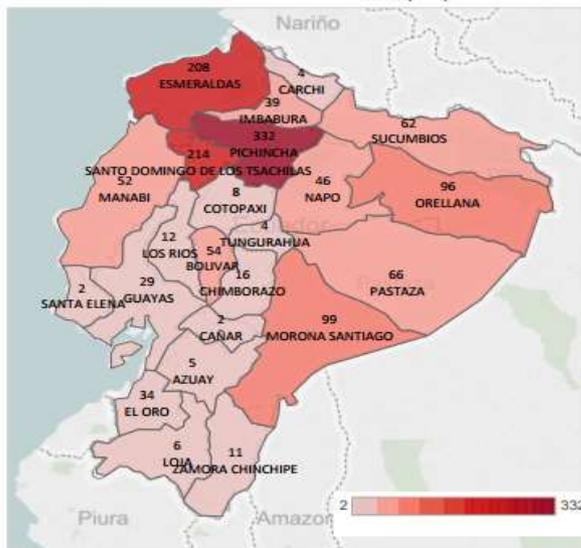


Figura 3. Número de casos reportados en 2015 de leishmaniasis en cada provincia.

Tomado de Gaceta epidemiológica N° 53, 2016, pp. 77

En el 2015 un total de 1.401 casos fueron reportados en todo el país en todas las provincias de Ecuador continental; el 53,8% de los casos corresponden a las provincias de Santo Domingo de los Tsachilas, Esmeraldas y Manabí (MSP, 2016).

2.1.4 Leishmaniasis cutánea y mucocutánea

La leishmaniasis de tipo cutánea es endémica de la mayoría de las provincias de Ecuador, principalmente en la región costa y valles andinos del país, mientras que la mucocutánea es más prevalente en la región amazónica (Guamán, Armijos y Munchero, 2013, pp. 181- 186). La leishmaniasis cutánea se caracteriza por la aparición de úlceras, de alrededor de 5 mm de diámetro en la piel, que pueden ser únicas o múltiples también como placas o nódulos. Dichas lesiones aparecen 15 días después de la picadura del flebótomo y permanecen en la misma región del cuerpo, pero en algunos casos el parásito se moviliza por los vasos linfáticos, hasta llegar a otras partes de la piel o incluso a las mucosas, produciendo así leishmaniasis mucocutánea (Calvopiña, Armijos y Hashuguchi, 2004, pp. 663-672; Organización Panamericana de la Salud, 2013, pp. 19-22). Las lesiones no producen dolor, excepto si se presenta sobreinfección bacteriana o viral o si se ubican en el pabellón auricular. A pesar de que se pueden curar espontáneamente, pueden durar de meses a años y además dejar cicatrices permanentes; otras veces pueden ser difíciles de tratar incluso con medicamentos (Organización Panamericana de la Salud, 2013, pp. 19-22).

Para el diagnóstico es necesario tomar en cuenta la distribución geográfica del vector, es decir donde exista mayor riesgo de infección, regiones tropicales, subtropicales y lugares que estén a menos de 1800 msnm; el nivel de contacto con personas contagiadas y con animales que actúan como reservorio del parásito. El diagnóstico también se realiza por métodos directos e indirectos. El

método directo es fácil, rápido y eficaz y se puede observar al parásito en forma de amastigote y promastigote, obteniendo la muestra directamente de las lesiones, realizando un frotis con tinción y observación en microscopio. Por otro lado, el método indirecto se basan en la respuesta inmune con acción de anticuerpos; los ensayos ELISA y DOT-ELISA son los más usados (Guamán, Armijos y Manchero, 2013, pp. 181-186).

Tres tipos de parásitos estas relacionados a la mayoría de casos de leishmaniasis cutánea: *L. braziliensis* y *L. mexicana* en América mientras que *L. major* en el Viejo Mundo. El periodo de incubación varía de 7 a 90 días y las úlceras suelen desaparecer de 6 a 12 meses. Se pueden producir infecciones secundarias debido a que la inmunidad no es completa, llamándose leishmaniasis cutánea difusa; la infección se difunde asemejándose a la lepra. Por lo general es causada por *L. mexicana amazonensis* (Claborn, 2010, pp. 127-134).

La leishmaniasis mucocutánea está relacionada con el parásito *L. braziliensis*. Esta infección se inicia en el tabique nasal y causa mutilaciones graves en los labios, encías, faringe, paladar y amígdalas. En ocasiones, el daño es tan grave que puede causar la muerte por desnutrición o neumonía respiratoria aguda (Claborn, 2010, pp. 127-134).

2.1.5 Ciclo biológico de la *Leishmania*

El ciclo de vida de la mayoría de especies de *Leishmania* es idéntico y se desarrolla en dos hospederos distintos: un vertebrado y un artrópodo (flebótomo). El hospedero vertebrado puede ser uno silvestre, de donde es endémico, y el segundo en humanos y/o en animales domésticos o peridomésticos, es decir de animales que habitan cerca de las residencias humanas (Ampuero, 2000, pp. 9-11).

La leishmania tiene dos fases principales, una llamada promastigote, que se desarrolla en forma extracelular; se caracteriza por ser una célula alargada, fusiforme y flexible. Se mueve a través de la acción de un flagelo. El núcleo está ubicado en la mitad y presenta un cinetoplasto ubicado entre el núcleo y el flagelo. Esta fase ocurre en el vector flebótomo. La segunda forma denominada amastigote, que es la forma intracelular, se desarrolla en macrófagos y tiene forma ovalada, redondeada y no posee flagelo. El cinetoplasto está ubicado muy cerca del núcleo y ocurre en los vertebrados (Witremundo, s.f.).

El ciclo de infección empieza con el vector flebótomo hembra alimentándose de un hospedero. Puede ingerir tanto el parásito en forma de amastigote, que se encuentran en la piel o macrófagos infectados, en un periodo de 24 a 48 horas. Dentro del intestino del vector, los amastigotes se transforman en promastigotes y se dividen por fisión binaria. Una vez replicados migran hacia esófago, faringe y proboscis del vector (Bonfante-Garrido, Urdaneta, Urdaneta y Alvarado, 1990, p. 477; Sánchez, et al, 2004, pp. 82-98).

El ciclo continúa cuando el vector infectado pica a otro hospedero, al cual puede inocular de 10 a 100 promastigotes. En ocasiones, los parásitos se acumulan en la proboscis del vector cuando la infección es excesiva. Esto provoca que no se pueda alimentar libremente y realice múltiples picaduras, inoculando en diferentes partes de la piel (Witremundo, s.f.; Sánchez, et al, 2004, pp. 82-98)

Una vez que los promastigotes penetran la dermis, se ubican en el espacio extracelular, lo que provoca la acumulación de macrófagos y neutrófilos. Los promastigotes ingresan en las células del tejido reticuloendotelial como los macrófagos. En un periodo de 3 a 4 horas se transforman en amastigotes, y permanecen en latencia por 36 horas hasta reproducirse por fisión binaria, empezando por el cinetoplasto. El número de amastigotes puede llegar hasta los 200, lo que provoca que las células se lisen, liberando a los amastigotes

que infectarán a otras células del sistema inmune. El vector pica al hospedero y el ciclo vuelve a iniciar (Sánchez, et al, 2004, pp. 82-98).

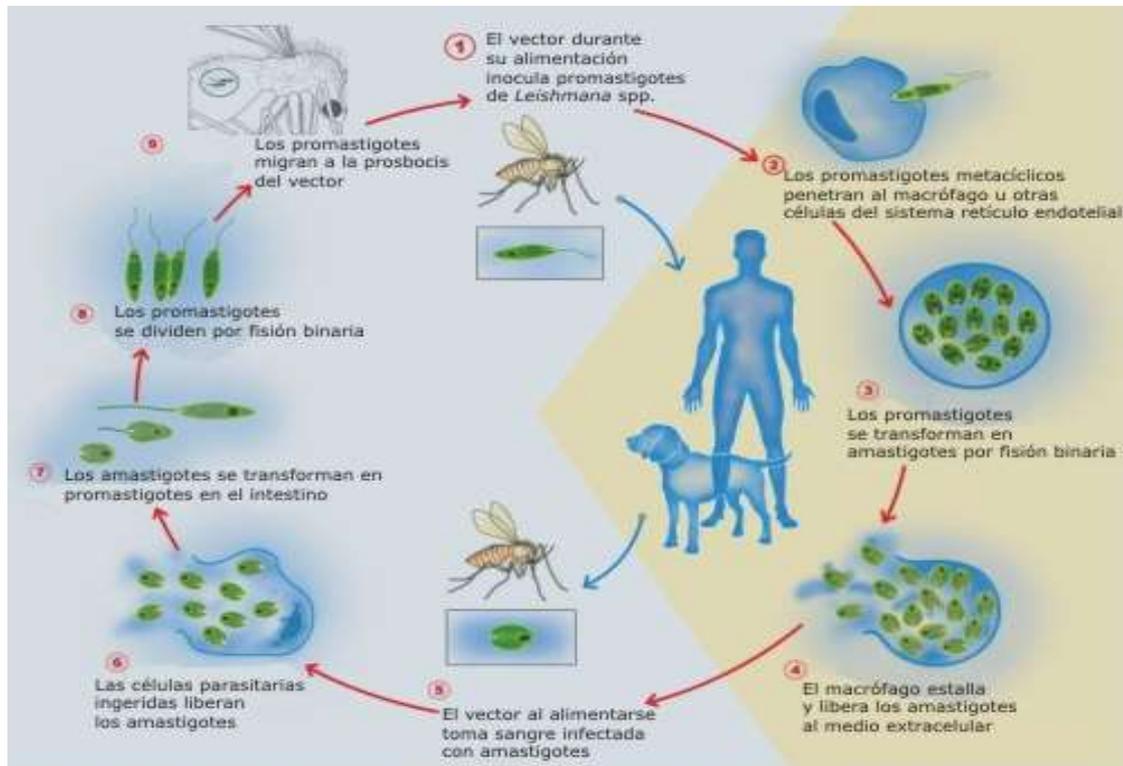


Figura 4. Ciclo de vida de la *leishmania*.

Tomado de Montalvo, Fraga, Monzote, García y Foncesa, 2012, pp. 120

2.2 El vector

Los vectores son insectos dípteros conocidos como flebótomos (ver abajo taxonomía completa en la Tabla 1). Existen 5 especies de flebótomos en el mundo: *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Lutzomyia*, *Warileya* y *Brumptomyia*. (Sánchez, et al, 2014, pp. 82-98). La importancia médica de los flebótomos está determinada por su capacidad vectorial. Sin embargo, solo *Phlebotomus* y *Lutzomyia* han sido reconocidos como vectores de parásitos como *Leishmania*; bacterias como *Bartonella bacilliformis*, causante de la enfermedad

de Carrión; y de virus como el responsable de la estomatitis vesicular (Vela, 2014).

Tabla 1

Taxonomía del vector flebótomo.

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Diptera
Suborden	Nematocera
Familia	Psychodidae
Subfamilia	Phlebotominae
Género	<i>Phlebotomus/Lutzomyia</i>

Tomado de Sharman y Singh, 2008, pp. 255-272.

2.2.1 Morfología

Los flebótomos también conocidos como “moscas de arena” o manta blanca en nuestro país, por su color marrón oscuro, están distribuidos en las regiones tropicales, subtropicales y lugares con climas cálidos en todo el mundo (Hamilton, 2008, pp. 252-256; Maroli, Feliciangeli, Bichaud, Charrel y Gradoni, 2013, pp. 123-147).

Las especies de *Lutzomyia* adultas, que son los vectores conocido en América presenta la siguiente forma: tamaño diminuto, que varía de entre 1,5 a 3,5 mm de largo, ojos grandes y negros con patas largas y delgadas; sus alas son lanceoladas, muy diferentes a las de otras moscas; se encuentran dispuestas en forma de “V” perpendiculares en 40° con respecto al tórax. Su cabeza, tórax, abdomen y alas están cubiertos por abundante pelo. Sus antenas son similares en ambos sexos, además las partes bucales son pequeñas y en la hembra se han adaptado para la succión de sangre (Salomón 2009, pp. 3-15; Servise, 2008, pp. 94-100).

En la figura 5 se puede observar la morfología externa un espécimen de *Lutzomyia* macho y hembra.



Figura 5. Morfología externa de *Lutzomyia*.

a. *Lutzomyia* macho.

b. *Lutzomyia* hembra.

La cabeza es suboval y piriforme, aunque varía su forma dependiendo de la especie, con ojos compuestos de gran tamaño, y muy separados. Las partes bucales están ubicadas hacia abajo. Presentan dos pares de antenas cubiertas por pelo de 16 segmentos cada una, de igual manera presentan un par de palpos que constan de 5 segmentos conocidos como palpómeros (Figura 6A) (Carbone 2002, pp. 5-10).

La estructura de la cabeza más importante es el cibario, que se encuentra entre la faringe y las piezas bucales. La parte posterior del cibario, en especial de las hembras, presenta dientes tanto horizontales como verticales, los cuales son una parte fundamental para la identificación taxonómica de especie (Figura 6B) (Young y Rogers, 1984, pp. 597-611).

El tórax está compuesto de tres segmentos; a cada uno de ellos se unen dos patas. La localización de la pigmentación en el tórax también se usa como criterio para distinguir algunas especies de *Lutzomyia* (Carbone, 2002, pp. 5-10).

El abdomen varía de tamaño según la especie y sexo. En los machos la terminal o genitalia presenta dos estructuras claramente visibles: el coxito y el estilo. El coxito por lo general de mayor tamaño que el estilo. Al final del estilo, se puede observar la presencia de espinas y setas (Figura 6 D). Una estructura importante es la bomba genitálica interna, la cual empuja el semen y el líquido seminal durante el apareamiento (Figura 6E) (Young y Duncan, 1994, pp. 28-33).

En las hembras no hay estructuras como coxito y estilo; por lo contrario, en el interior del abdomen se encuentra la furca en forma de "Y" invertida, con un conducto espermático único o conductos espermáticos individuales. Al final de cada conducto se unen las espermatecas con formas y tamaños diferentes, dependiendo de la especie (Figura 6C) (Young y Duncan, 1994, pp. 28-33; Carbone, 2002, pp. 5-10).

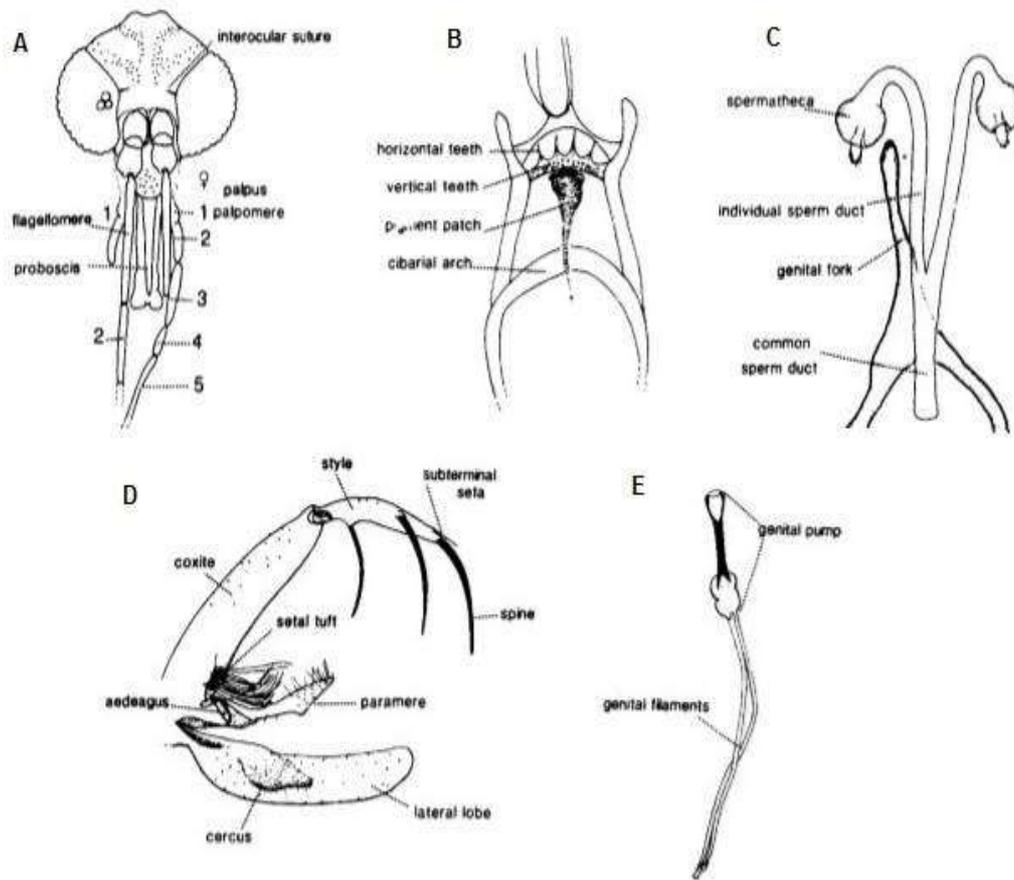


Figura 6. Morfología interna de *Lutzomyia*
 Tomado de Young y Duncan, 1994, pp. 101

- a. Cabeza de *Lutzomyia* donde se observa sus ojos, antenas y palpos.
- b. Cibario con dientes horizontales y verticales.
- c. Furca, conductos espermáticos y espermatecas.
- d. Genitalia del macho con sus estructuras.
- e. Bomba espermática del macho.

2.2.2 Comportamiento

En muchos países de Latinoamérica, incluyendo el Ecuador, a las especies de *Lutzomyia* se las conoce como “manta blanca”, debido a la forma que presenta cuando vuelan en grupo. Su hábitat constituyen los lugares húmedos con abundante vegetación y material orgánico en descomposición. A pesar de esto pueden sobrevivir en zonas desérticas y peridomiciliares (Sánchez, *et al*, 2004, pp. 82-98).

Sus hábitos alimenticios son crepusculares. En las mañanas descansa en los orificios de rocas y troncos de árboles, mientras que al atardecer se desplazan en busca de alimento. Aparecen aproximadamente desde las 18 horas hasta las 20 horas y desaparecen progresivamente hasta las 7 horas del siguiente día. Su método de vuelo es dando saltos hasta de un metro, manteniendo su vuelo. Puede desplazarse alrededor de 200 metros, aunque en ocasiones el viento le ayuda a cubrir más territorio (Sánchez, *et al*, 2004, pp. 82-98).

Tanto hembra como macho se alimentan de azúcares orgánicas, por ejemplo la savia de árboles y rocío de miel producido por áfidos. No obstante, sólo las hembras se alimentan de sangre que le proporciona los nutrientes necesarios para la producción de huevos. En algunas especies, la primera producción de huevos no necesita de ingesta de sangre, por lo contrario otras especies necesitan de más de una ingesta, lo que aumenta la eficiencia de transmisión de leishmaniasis (Killick-Kendrick, 1999, pp. 279-289).

2.2.3 Reproducción

El apareamiento está relacionado con la ingesta de sangre y depende de la especie. En algunas especies las hembras se aparean antes de la ingesta, mientras que otras durante o después. Los primeros en llegar al vertebrado que servirá como fuente de alimento son los machos, estableciendo un territorio. La hembra reconoce las feromonas producidas por el macho y por una especie de

canto que producen con las alas. El comportamiento de apareamiento se conoce como *lekking* (Alexander, 2000, pp. 109-122).

Luego del apareamiento, los espermatozoides y el fluido seminal forman un tapón, que impide que la hembra vuelva a ser inseminada. La maduración de los huevos depende de la especie, velocidad de digestión y temperatura ambiente (Killick-Kendrick, 1999, pp. 279-289; OMS, 2010, pp. 5-11).



Figura 7. Apareamiento de *Phebotomus perniciosus* después de la ingesta sanguínea. Tomado de Maroli, Feliciangeli, Bichaud, Charrel y Gradoni, 2013. Pp, 125

2.2.4 Ciclo biológico

Los flebótomos cumplen su ciclo de vida con cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Para los primeros estados, a diferencia de otros mosquitos, no necesita de agua estancada. La hembra realiza la ovoposición en lugares húmedos y ricos en material orgánico como excremento de animales, que proporcionan a las larvas eclosionadas un hábitat rico en humedad y nutrientes (Maroli, Feliciangeli, Bichaud, Charrel y Gradoni, 2013, pp. 123-147).

Huevo. Según la especie de flebótomo, las hembras pueden depositar de 40 a 70 huevos y su tiempo de incubación, por estudios realizados en laboratorio, varía de 8 a 19 días. Su forma es larga y elíptica de tamaño muy pequeño (de alrededor de 0,3 a 0,5 mm). Al momento de la ovoposición su color es blanco o un poco gris, pero unas horas después se torna de color marrón oscuro o negro (Figura 8A).

Larva. El aspecto de las larvas es parecido al de una oruga; son largas y planas, están formadas por 12 segmentos y presentan una cápsula en su cabeza, en la cual presenta cerdas que se diferencian por su estadio. El estado larvario comprende 4 etapas conocidos como estadios que se diferencian una de otra por su tamaño y el número de cerdas. Para llegar a pupa podría tardar de 25 a 59 días (Figura 8B, C, D, E).

Pupa. La pupa puede ser considerada como una pequeña crisálida, su tamaño es de 2 mm. Permanece fija a un sustrato en la parte posterior, por lo que son más resistentes a las variaciones climáticas. Su estadio puede durar de 8 a 14 días (Figura 8F).

Adulto. Los machos flebótomos por lo general eclosionan de la pupa más rápido que las hembras. A las 24 horas de eclosionar los genitales del macho se colocan en su posición habitual para la reproducción (Figura 8G). (Carbone, et al, 2002, pp. 5-10; Maroli, Feliciangeli, Bichaud, Charrel y Gradoni, 2013, pp. 123-147; Alexander, 2000, pp.109-122; OMS, 2010, pp. 5-10; Service, 2008, pp. 94-100; Russell, Otranto, Wall, 2013, pp. 227-300).

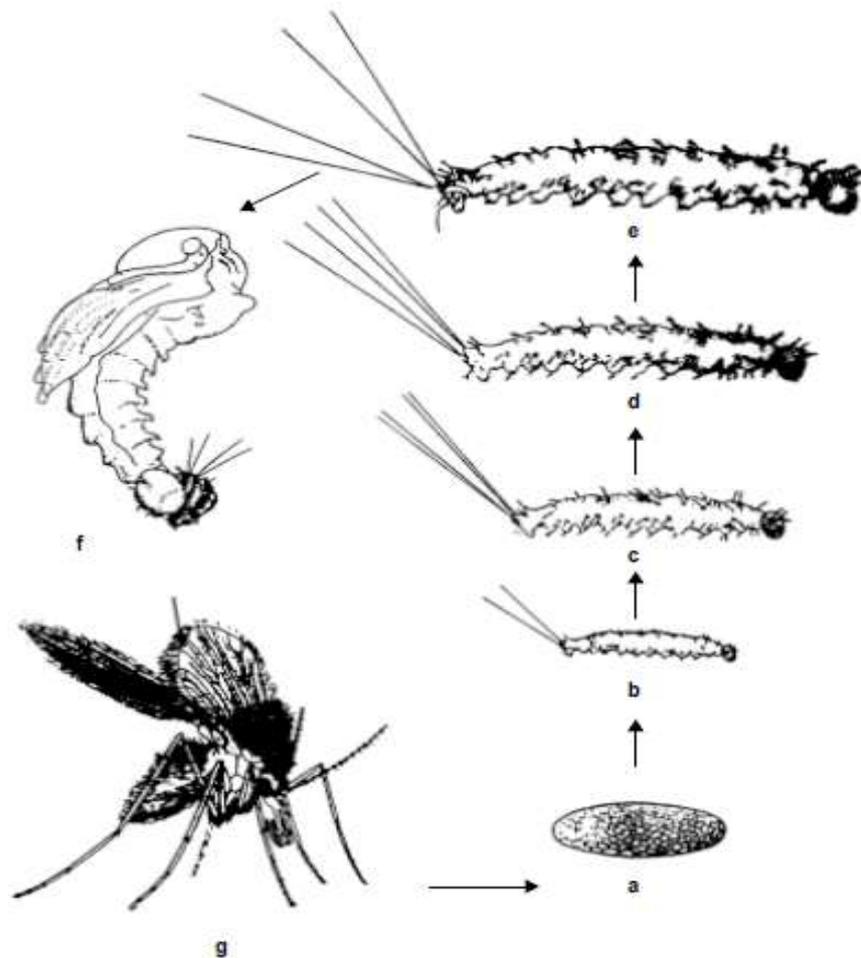


Figura 8. Ciclo biológico de flebotomos.
 Tomado de Carbone, et al, 2002, pp. 160
 a. Huevo de *Lutzomyia*.
 b. Larva primer estadio.
 c. Larva segundo estadio.
 d. Larva tercer estadio.
 e. Larva cuarto estadio.
 f. Pupa.
 g. *Lutzomyia* adulta.

2.2.5 Incriminación como vector

No todas las especies de *Lutzomyia* transmiten el parásito y no todas las especies se alimentan de sangre humana. Su distribución no siempre es

la misma que la del hospedero, o incluso su preferencia alimenticia no incluye al hospedero. Sin embargo, la incriminación como vector se basa en que el parásito es capaz de sobrevivir en el intestino de la mosca. Los promastigotes son capaces de vivir en el intestino medio del abdomen gracias a ligandos específicos presentes en las células intestinales de la mosca como lipofosfoglicano y lectina (Killick-Kendrick, 1999, pp. 279-289).

Las especies que se alimentan de sangre humana y animales que, actúan como reservorios, suportan el desarrollo del parásito después de la ingesta de sangre infectada, y son capaces de transmitirlo a través de su picadura. La saliva del flebótomo tiene una variedad de agentes tales como anticoagulantes, vasodilatadores, agentes antiplaquetarios, moléculas antiinflamatorias e inmunomoduladores; además de mejorar la carga parasitaria, estos agentes regulan la producción de citoquinas como TNF- α , Th2 e IL-6, aumentando o disminuyendo la proliferación de células del sistema inmune. Es decir que la saliva incrementa el riesgo de infección, en especial de leishmaniasis cutánea (Maroli, Feliciangeli, Bichaud, Charrel y Gradoni, 2013, pp. 123-147)

A través de la co-evolución, se ha dado una interacción entre vector y parásito. La picadura del vector, a más de ayudar a pasar la barrera física primaria del sistema inmune como es la piel, provoca una respuesta inflamatoria acompañada de la proliferación de células como linfocitos, macrófagos y neutrófilos, los cuales fagocitan a los promastigotes facilitando su ubicación intracelular y por lo tanto la infección (Nieves, Sánchez y Rondón, 2013, pp. 23-31).

2.3 Hospedero

Los hospederos de *Leishmania* pueden ser tanto zoonóticos, que corresponden a animales salvajes o domésticos, y los huéspedes antroponóticos que son los

humanos. Por lo general una especie de *Leishmania* está ligada a un tipo de flebótomo y a un reservorio vertebrado, no obstante la infección accidental a otro tipo de mamíferos, ayuda a mantener el ciclo de infección como también ponerse en contacto con humanos (OMS, 2010, pp. 25-30).

Existe una larga lista de hospederos vertebrados que incluye 62 especies de mamíferos, 46 géneros, 21 familias y 9 órdenes, que están envueltos en la transmisión de leishmaniasis (Haouas, et al, 2007, pp. 1054-1059; Paternina, 2012). Los hospederos mamíferos, en ocasiones no presentan signos de infección, por la baja carga parasitaria en piel o vísceras. Por otro lado el perro que es un huésped reservorio, incluso puede llegar a la muerte por la infección ya que presenta una gran carga parasitaria especialmente en la piel que, ayuda a que el vector capte fácilmente los parásitos. En Ecuador se ha detectado infección por *L. panamensis* y *L. mexicana* en perros de la región Costa y la región de valles andinos (Calvopiña, Armijos y Hashiguchi, 2004, pp. 663-672).

No se puede considerar que un vertebrado sea un huésped reservorio solo por estar infectado. El individuo debe cumplir ciertos requisitos como: proporcionar una gran cantidad de alimento al vector; tener un contacto muy directo con el hábitat del flebótomo que le permita transmitir el parásito, por ejemplo las madrigueras de animales en donde las moscas pueden subsistir. La infección debe mantenerse en el hospedero por largo tiempo y no debe ser mortal, por lo menos hasta asegurar su transmisión; la carga parasitaria en la piel y la sangre deben ser muy elevadas para infectar al vector (OMS, 2010, pp. 25-30).

Los hospederos en América más importantes según la Organización Mundial de la Salud son perros (*Canis familiaris*), zorros (*Cerdocyon thous*) que adquieren la infección por la cercanía con los perros, perezosos (*Choloepus didactylus*), osos hormigueros (*Tamandua tetradactyla*), zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*) y varios roedores. En Ecuador los reservorios hospederos que han sido identificados son perros, ardilla roja (*Sciurus vulgaris*), el kinkajú o

cusumbo (*Potos flavus*) y osos hormigueros (Calvopiña, Armijos y Hashiguchi, 2004, pp. 663-672; OMS, 2010, pp. 25-30).

2.3.1 Identificación de la fuente alimenticia

La identificación de la ingesta sanguínea es importante para la determinación del huésped reservorio del parásito en condiciones naturales. Además nos brinda información para establecer estrategias de control y vigilancia epidemiológicas eficientes (Haouas, 2007, pp. 1054-1059; Abbasi, Cunio y Warburg, 2009, pp. 79-86; Passos Días, Seixas y Macário, 2003, pp. 1373-1380).

La principal estrategia para la identificación de las fuentes y preferencia alimentaria es la colecta de animales salvajes para aislamiento, con el flebótomo posiblemente infectado. Esta técnica ha arrojado importantes resultados, empero la colección de una cantidad significativa de animales es muy laboriosa y requiere de largos periodos, adicionalmente la colecta de todas las especies de fauna en áreas como la selva amazónica es casi imposible (Paternina, 2012; Haouas, 2007, pp. 1054-1059).

Hace algunos años e incluso en la actualidad la identificación de ingesta alimenticia de artrópodos, incluidos los flebótomos, se la realiza a través de técnicas serológicas, como por ejemplo pruebas de precipitación, pruebas de aglutinación y ensayos ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). A pesar de la gran cantidad de datos que estos estudios han proporcionado, consumen demasiado tiempo y la sensibilidad es baja. Por ello el campo de la biología molecular ha incursionado en este tema. A partir de una extracción de ADN nuclear o mitocondrial, se ha diseñado en laboratorio técnicas de PCR que permiten obtener la misma cantidad de datos de forma más eficiente (Chávez, Harrington, Keogh, Nguyen, Kitron, 2010, pp. 2-11; Kent y Norris, 2005, pp. 336-342; Ngo y Kramer, 2003, pp. 215-222; Maleki, Oshaghi, Javadian, Rassi, Sadraie, Mohtarami, 2009, pp. 8-18).

Para la técnica de PCR es preferible el uso de ADN mitocondrial al genómico, debido a su alto número de copias por célula. El Citocromo B (*cytB* mtDNA) es la única proteína que codifica para el genoma mitocondrial, es muy estudiada y caracterizada, pertenece al Complejo III del sistema de fosforilación oxidativa de la mitocondria (Kent y Norris, 2005, pp. 336-342). El ADN mitocondrial del citocromo B ha sido utilizado para estudios de evolución, identificación de especies y detección de ADN de mamíferos (Ngo y Kramer, 2003, pp. 215-222).

Mediante el uso de primers específicos para citocromo B, es posible hacer un análisis molecular de la ingesta sanguínea en flebótomos hembras alimentadas, debido a la presencia de múltiples polimorfismos genéticos en las secuencias primarias entre especies de vertebrados (Kent y Norris, 2005, pp. 336-342).

En el presente estudio se utilizó un set de primers específicos, basados en la secuencia del citocromo B de diferentes vertebrados (que incluyen mamíferos y aves) para la identificación de la ingesta sanguínea en hembras *Lutzomyia* colectadas en cuatro provincias del Ecuador, dos de la región costa y dos de la región amazónica.

Capítulo III. Diseño de Plan Experimental

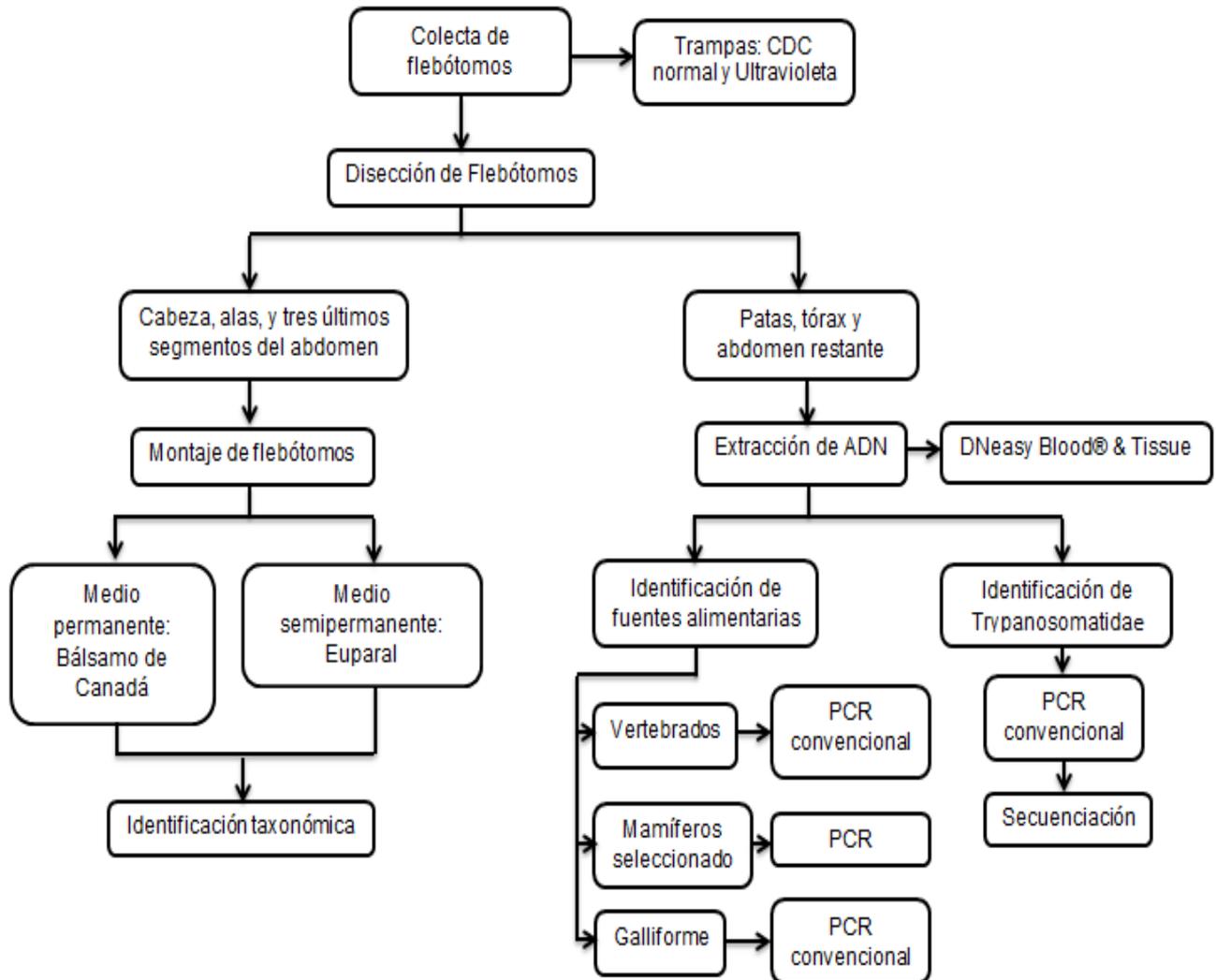


Figura 9. Diagrama de flujo del diseño experimental.

Capítulo IV. Procedimiento para la obtención de datos

4.1 Población y muestra

4.1.1 Área de estudio

La colecta en campo se la realizó en 4 localidades correspondientes a las provincias de Guayas, Manabí, Sucumbíos y Pastaza.

La primera colecta se realizó en la provincia de Guayas, en la localidad de Progreso, perteneciente al cantón Guayaquil. La parroquia rural Juan Gómez Rendón, también conocida como Progreso se ubica al oeste de la ciudad de Guayaquil, en las coordenadas 2,40767°S y 80,3656°O. Cuenta con una superficie de 326,45 km² y una población total de 11.897 habitantes. El clima de la zona se divide en dos temporadas: una lluviosa húmeda correspondiente a los meses de enero a mayo, donde se da un promedio del 97% de la precipitación anual; y la temporada seca que va del mes de junio a diciembre. La temperatura promedio es de 25 a 28°C (Gobierno Autónomo Descentralizado de Progreso, 2016).

La segunda colecta fue realizada en la provincia de Manabí, en la parroquia Calceta, cabecera cantonal de Bolívar. Este cantón está ubicado a 49 km de la ciudad de Portoviejo y a una altura de alrededor de 22 msnm. Sus coordenadas son 0,841944°S y 80,161944°O. Presenta una extensión territorial de aproximadamente 537,8 Km², con una población total de 17.632 habitantes que se dedican a actividades agrícolas, siendo la principal el cultivo de cacao, el cual es factible gracias a su clima cálido tropical, cuya temperatura oscila entre los 26 a los 28°C (Torres, 2016).

La tercera colecta se la realizó en la ciudad de Shushufindi, cabecera cantonal de Shushufindi en la provincia de Sucumbíos. El cantón cuenta con una extensión de 2463,1 km² en la que habitan alrededor de 50456 habitantes, con una altura de entre 200 a 320 msnm Shushufindi se caracteriza por la

presencia de extensos bosques amazónicos y por ser parte de grandes reservas biológicas, la temperatura mínima que alcanza es de 18,7°C y la máxima de 29,3°C, sus coordenadas son 0,1871°S y 76,645°O (Alcandía de Shushufindi, 2016).

La última localidad en la que se realizó la colecta fue en la parroquia de Shell, perteneciente al cantón Mera de la provincia de Pastaza. A pesar de no ser la cabecera cantonal es una de las parroquias más pobladas de Pastaza, con 5490 habitantes. La superficie total es de 38 km² con una elevación de 1.067 msnm y su temperatura oscila entre los 17 a los 23°C. Sus coordenadas son 1,499322°S y 78,062833°O (Gayanlema, 2004).

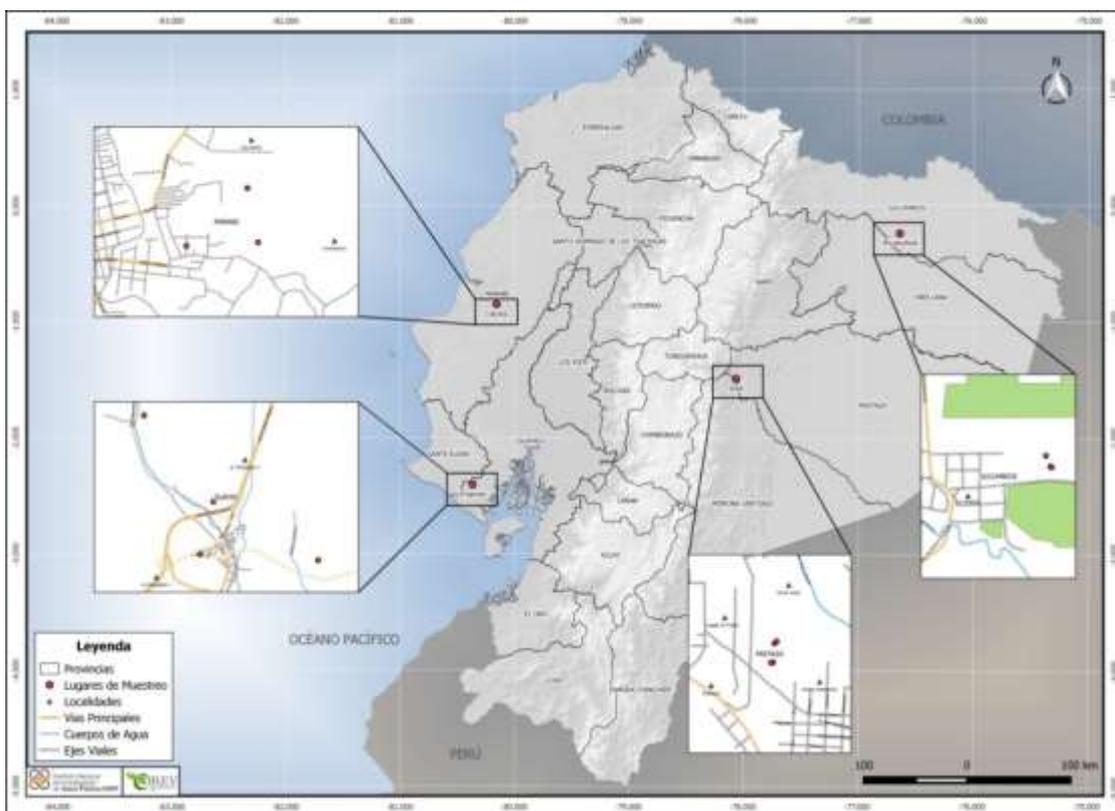


Figura 10. Mapa de las zonas de colecta en campo en las cuatro localidades: Progreso (Guayas), Calceta (Manabí), Shushufindi (Sucumbios), Shell (Pastaza).

Tomado de Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, 2016

4.1.2 Colecta de flebótomos en campo

Para la colecta en campo, se usaron trampas con atrayente luminoso tipo CDC (Center for Disease Control and Prevention, BioQuip Products, USA), tanto de luz normal como luz ultravioleta. Las trampas CDC fueron diseñadas por Sudia y Chamberlain en 1962 (Pérez, Villaseca, Llanos, Campos y Guerra 1987, pp. 77-80) (Figura 11). Cuentan con un tubo transparente de polietileno de 14 cm de largo y 11 cm de ancho, el cual contiene un motor de 12 voltios que gira a 3500 rpm y un foco de 6 voltios en el caso de las trampas con luz normal y un adaptador para una lámpara UV en el caso de las trampas con luz ultravioleta. La parte inferior es de tul o malla transparente y una canasta de recolección, que es donde los especímenes serán capturados (Salazar, Fernández, Iannacone, Morales y Espinoza, 2006, pp. 87-97; Carbone, *et al*, 2002, pp. 11-18)



Figura 11. Trampa CDC de luz normal y trampa CDC de luz ultravioleta

Las trampas fueron colocadas en las áreas de estudio, siguiendo el modelo de transecto lineal. Esta técnica permite eliminar las diferencias de altura del desnivel del suelo. De esta manera, se considera que toda la superficie de muestreo está a la misma altura. Para ello es necesaria la ubicación geográfica exacta de cada trampa, junto con datos medio ambientales de cada zona (Anaguano, *et al*, 2015, pp. 116-120). Las trampas se colocaron en 5 puntos diferentes, separadas por aproximadamente 150 metros en cada localidad, donde las características ambientales favorecían la presencia del vector. La colecta se realizó tanto a nivel peri-domiciliar como en el bosque (Figura 12).

Las colectas fueron efectuadas en las fechas: Progreso, del 27 al 30 de julio del 2015; Calceta, del 9 al 11 de septiembre del 2015; Shushufindi, del 11 al 13 de noviembre del 2015; Shell, del 1 al 3 de marzo del 2016. La colecta se la realizó durante tres noches seguidas desde las 18h00 hasta las 06h00 de la mañana siguiente. Las trampas se colocaron a una altura de un metro con referencia al suelo, en lugares con abundante materia orgánica y vegetación (Figura 12).



Figura 12. Ubicación de trampas CDC en campo
a. Ubicación de trampa CDC de luz UV en bosque.
b. Ubicación de trampa CDC de luz normal peri-domicilia.

Las trampas en zona peri-domiciliar se las ubicó aproximadamente a una distancia de hasta 300 metros de las viviendas, donde usualmente se encuentran los corrales de animales domésticos y las parcelas de cultivo. En el caso de la región costa, especialmente en la parroquia de Calceta. Las trampas se ubicaron en cultivos de cacao (Figura 11). Por otro lado, para las trampas en zona de bosque, se tomó una distancia desde 300 hasta 600 metros para su ubicación, tomando en cuenta las características ambientales favorables para el hábitat del flebótomo, como la abundante vegetación que evite el paso de luz y corrientes de aire, madrigueras de animales y lugares con materia orgánica en descomposición.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Procesamiento de flebótomos

Los insectos que se colectaron en las trampas fueron colocados en una hielera con geles fríos durante una hora. Posteriormente se los almacenó en cajas Petri identificadas según la ubicación de la trampa y día de colecta, para ser transportadas hasta el laboratorio del CIT en la UDLA. Una vez en laboratorio, los individuos que se identificaron como *Lutzomyia* fueron separados de resto de insectos, usando pinzas entomológicas N°5 (VIOLA, Italia) y con ayuda del estereoscopio Discovery VI2 (ZEISS, Alemania). Cada individuo fue colocado en microtubos de 1,5 ml separados, según su sexo en macho y hembra y, a su vez las hembras según su estado alimenticio (en alimentadas y no alimentadas) (Figura 13).



Figura 13. Hembra Lutzomyia alimentada

Las hembras con ingesta fueron disectadas con alfileres entomológicos en dos grupos: el primero incluye la cabeza, las alas y los tres últimos segmentos del abdomen; mientras que en el segundo se encuentra el tórax, las patas y el abdomen restante. Con el primer grupo se realizó el montaje en placa para su posterior identificación taxonómica y el segundo grupo se lo almacenó a -20°C en microtubos de 0,2 mL hasta realizar los ensayos moleculares.

4.2.2 Montaje e identificación taxonómica de flebótomos

La cabeza, alas y tres últimos segmentos del abdomen fueron sometidos a un proceso de clarificación: (1) Las partes disectadas de los especímenes de *Lutzomyia* se sumergieron en agua jabonosa (5:1) durante 10 minutos. (2) Se pasaron por agua destilada para enjuagar. (3) La clarificación se realizó colocando el espécimen en hidróxido de potasio (KOH) al 10% durante un

periodo de 12 a 18 horas. (4) Luego de este tiempo, se usó ácido acético (CH_3COOH) durante 10 minutos para eliminar los residuos de KOH. (5) Finalmente se pasó por una batería de etanol, que corresponde a etanol al 70%, 90% y absoluto cada uno durante 10 minutos. Una vez terminado el proceso, cada individuo fue colocado en etanol al 70 % hasta su montaje en placa.

El montaje se realizó en placas de microscopía con medio permanente y semipermanente (Bálsamo de Canadá y Euparal Merck® respectivamente). Una vez realizado el montaje se identificó taxonómicamente usando la clave taxonómica de Young y Duncan, basándose en la similitud del cibario, alas, palpos y espermateca, mediante la observación en microscopio OLYMPUS BX43 (Olympus, EE.UU).

4.2.3 Extracción de ADN

A partir del tórax, patas y abdomen, se realizó la extracción de ADN utilizando el kit comercial DNeasy Blood® & Tissue (QIAGEN), con el protocolo del fabricante y las modificaciones descritas por Beati y Kenars (2001).

Cada individuo fue colocado en microtubos de 1,5 mL estériles y rotulados cuidadosamente con la información respectiva de cada flebotomo.

Se colocó 250 μL de Buffer de lisis ATL (90% de buffer ATL y 10 % de proteinasa K) en cada tubo con la muestra. Se cortó cada parte de la muestra usando tijeras de microdissección hasta que los pedazos sean imperceptibles. Se incubó a 56°C durante toda la noche (sin sobrepasar las 15 horas) en un bloque térmico.

Pasado este tiempo, se colocó las muestras en el vórtex por 15 segundos; se añadió 200 μL de buffer AL y se volvió a someter a vórtex por 15 segundos. Se agregó 200 μL de etanol grado molecular al 100% y se mezcló por vórtex. Todo el contenido del tubo se colocó en una columna dentro de un tubo colador de 2

mL. Se centrifugó a 8000 rpm por un minuto para luego descartar el filtrado; luego se añadió 500 µL de buffer AW1 y se centrifugó a 8000 rpm por un minuto; se eliminó el filtrado. Posteriormente, se añadió 500 µL de buffer AW2 y se centrifugó por tres minutos a 14000 rpm; se descartó el filtrado. Se volvió a centrifugar a 14000 rpm por un minuto para secar la columna.

La columna fue colocada en un tubo colector de 1,5 mL y se añadió 30 µL de buffer de elución AE dentro de la columna. Se dejó incubar por un minuto a temperatura ambiente, para luego centrifugar por un minuto a 8000 rpm. Este paso se repitió una vez más. Finalmente se descartó la columna y se almacenó la extracción en el tubo colector a -20°C hasta ser usada en las posteriores amplificaciones.

Cada muestra de ADN obtenida en la extracción fue cuantificada por medio de espectrofotometría, usando un lector de placas Synergy HT (BioTec Instruments, USA).

4.2.4 Amplificación de ADN de ingesta sanguínea

Para todas las amplificaciones de ADN se usó la enzima polimerasa Platinum® *Taq* DNA e Invitrogen (Life Technologies, USA), cada juego de primers usados en los ensayos, fueron sintetizados en Estados Unidos por Integrated DNA Technologies. Los ensayos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler Pro (Eppendorf, Alemania). Cada ensayo contaba con las muestras respectivas además de controles tanto positivos y negativos para descartar la presencia de contaminación.

4.2.4.1 Amplificación del gen *cytB* del ADN mitocondrial de vertebrados.

Se amplificó un segmento de ADN de 358 pb que corresponde al tamaño del fragmento del citocromo B, para ello el juego de primers fue: L14841 (forward, 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') y H15149 (reverse 5'-CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'). Las condiciones de la reacción y le

perfil térmico se detallan en la tabla 2 (Lah, Ahamad, Haron y Ming, 2012, pp. 223-227; Maleki et al., 2009, pp. 8-18)

Tabla 2

Condiciones para la PCR de cytB para vertebrados: concentración, volúmenes y perfil térmico

Reactivos	Concentración	Volumen (1x)	Perfil térmico	
			Buffer	1X
MgCl ₂	2 mM	1 µL	40 Ciclos	
Primer	0,5 µM	1,25 µL	Desnaturalización	95°C x 30 s
dNTPs	0,4 mM	0,5 µL	Alineamiento de primers	58°C x 30 s
<i>Taq</i> polimerasa	1,25 U/Rx	0,25 µL	Extensión	72°C x 45 s
ADN molde	25 ng/Rx	5 µL	Extensión Final	72°C x 5 min
Volumen final	25 µL			

El ensayo de PCR contó con un control negativo en el que se usó agua destilada libre de nucleasas y el control positivo, el cual fue ADN total humano que se extrajo de sangre, usando el kit comercial DNeasy Blood® & Tissue (QIAGEN)

4.2.4.2 Amplificación del gen *cytB* del ADN mitocondrial de mamíferos domésticos

En la PCR multiplex, se amplificó en al ADN mitocondrial del citocromo B correspondiente a 4 mamíferos domésticos los cuales son: perro (*Canis familiaris*), cerdo (*Sus scrofa domesticus*), vaca (*Bos Taurus*) y cabra (*Capra hircus*), incluyendo también en este ensayo a humanos. Los primers usados fueron descritos por Kent y Norrs (2005, pp. 336-342) y se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Secuencias de primers para PCR multiplex y tamaño de fragmentos de cada amplicón.

ADN blanco	Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb)
<i>Homo sapiens</i>	Human741F	GGCTTACTTCTCTTCATTCTCTCCT	334
<i>Sus scrofa domesticus</i>	Pig573F	CCTCGCAGCCGTACATCTC	453
<i>Bos Taurus</i>	Cow121F	CATCGGCACAAATTTAGTCG	561
<i>Canis familiaris</i>	Dog368F	GGAATTGTACTATTATTCGCAACCAT	680
<i>Capra hircus</i>	Goat1894F	CCTAATCTTAGTACTTGTACCCTTCCT C	132
Primer reverse	UNREV1025	GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA	-

Tomado de Kent, y Norris, 2005, pp. 336-342.

Con el propósito de evitar el alineamiento cruzado con ADN molde inespecífico, los primers fueron diseñados para secuencias blanco polimórficas, que tenían de 5 a 13 diferentes nucleótidos con relación a regiones homólogas en secuencias de otros animales del mismo género u orden (Kent y Norris, 2005, pp. 336-342).

Las concentraciones de los reactivos y las condiciones de ciclado se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 4

Concentración, volumen de reactivos y perfil térmico para PCR multiplex

Reactivos	Concentración	Volumen (1x)	Perfil térmico	
			Desnaturalización inicial	95°C x 5 min
Buffer	1X	2,5 µL	40 Ciclos	
MgCl ₂	3,5 mM	1,75 µL	Desnaturalización	95°C x 30 s
Primer	0,4 µM	0,4 µL	Alineamiento de primers	58°C x 30 s
dNTPs	0,8 mM	0,25 µL	Extensión	72°C x 45 s
<i>Taq</i> polimerasa	2,5 U/Rx	0,25 µL	Extensión Final	72°C x 5 min
ADN molde	25 ng/Rx	5 µL		
Volumen final	25 µL			

Se usó agua destilada libre de nucleasas como control negativo. A su vez, los controles positivos fueron ADN de cada mamífero doméstico y humano, los

cuales se obtuvieron por extracción de ADN total a partir de sangre con el kit comercial DNeasy Blood® & Tissue (QIAGEN).

4.2.4.3 Amplificación del gen *cytB* del ADN mitocondrial de galliformes

El tamaño del fragmento correspondiente al gen *cytB* del ADN mitocondrial de galliformes es de 210 pb. La amplificación se la realizó con los primers: GallF (Forward, 5'- ATTCGGCTCCCTATTAGCAG-3') y GallR (Reverse, 5'- GTCCGATGTGAAGGAAGATACAGATGAAGAAGAA-3') (Kent 2009, pp. 4-18; García-Rejón, et al, 2010, pp. 1-12). Las condiciones de reacción y el perfil térmico de la PCR están especificados en la siguiente tabla (Tabla 5).

Tabla 5

Condiciones de reacción para la amplificación del gen *cytB* de galliformes.

Reactivos	Concentración	Volumen (1x)	Perfil térmico	
			Buffer	1X
MgCl ₂	2 mM	1 µL	40 Ciclos	
Primer	0,5 µM	1,5 µL	Desnaturalización	95°C x 30 s
dNTPs	0,4 mM	0,5 µL	Alineamiento de primers	58°C x 30 s
<i>Taq</i> polimerasa	1,25 U/Rx	0,5 µL	Extensión	72°C x 45 s
ADN molde	25 ng/Rx	5 µL	Extensión Final	72°C x 5 min
Volumen final	25 µL			

El control negativo para este ensayo fue agua destilada libre de nucleasas, mientras que el control positivo fue ADN total de gallina extraído de sangre mediante el uso del kit comercial DNeasy Blood® & Tissue (QIAGEN).

4.2.5 Identificación de infección natural con *Leishmania* spp.

Existen muchos marcadores moleculares con los que se puede detectar la presencia de infección por *Leishmania* (Tojal de silva, Cupollillo, Volpini, Almeida y Sierra, 2006, pp. 1388-1398). En este caso se usaron primers específicos para la amplificación de una región conservada específica para la familia Trypanosomatidae en la que está incluida *Leishmania*.

4.2.5.1 Amplificación de la región de espaciador transcripcional interno ribosomal (ITS1).

Para la detección de *Leishmania*, se realizó una PCR para amplificar la región ITS del parásito, la cual varía en tamaño de 308 a 338 pb según la especie de parásito, la cual se puede identificar mediante digestión enzimática o secuenciación. Los primers usados fueron: L5.8S (forward 5' TGATACCACTTATCGCACTT) y LITSR (reverse 5' CTGGATCATTTTCCGATG) (Ferreira, *et al*, 2015, pp. 776-779; Jaouadi, *et al*, 2011, pp. 1-3). Las condiciones de la PCR y el perfil térmico se describen en la tabla 6.

Tabla 6

Condiciones de reacción de PCR para amplificación de segmento ITS de *Trypanosomatidae*.

Reactivos	Concentración	Volumen (1x)	Perfil térmico	
Buffer	1X	2,5 µL	Desnaturalización inicial	95°C x 4 min
MgCl ₂	2,5 mM	1,5 µL	35 Ciclos	
Primer	0,4 µM	1 µL	Desnaturalización	95°C x 1 min
dNTPs	0,4 mM	0,5 µL	Alineamiento de primers	58°C x 30 s
<i>Taq</i> polimerasa	2,5 U/Rx	0,5 µL	Extensión	72°C x 60 s
ADN molde	25 ng/Rx	5 µL	Extensión Final	72°C x 10 min
Volumen final	25 µL			

Para este ensayo de PCR se usó como control positivo ADN purificado extraído a partir de cultivo de promastigotes de *Leishmania mexicana* M373, la cual fue donada por la Universidad Cayetano Heredia (Lima, Perú). El control negativo fue agua destilada libre de nucleasas.

4.2.6 Electroforesis en geles de agarosa

Con el fin de visualizar el resultado de los ensayos de PCR descritos anteriormente, se realizó la electroforesis en gel de agarosa. Para ello se preparó un gel al 1 % en buffer TBE 1X, al gel se le colocó el colorante SYBR® GREEN Nucleic Acid Gel Stein (Invitrogen by Life technologies, USA). En cada

pocillo se cargó 10 μ L de los cuales 8 correspondían a los productos de PCR y los 2 μ L restantes a BlueJuice™ Gel Loading Buffer 10X (Invitrogen by Life technologies, USA). La electroforesis se corrió en buffer TBE 0,5X a 80 Voltios en un tiempo de 45 minutos. Finalmente la lectura se realizó en el sistema de documentación Enduro GDS (LabNert International, USA).

4.2.7 Secuenciación de ADN

Las muestras con resultado positivo para ITS1 fueron enviadas a purificar y secuenciar a través de MacroGen® (Corea), con el método de secuenciación capilar de tipo Sanger.

CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Colecta de flebótomos en campo

Un total de 222 especímenes de *Lutzomyia* fueron colectados en las localidades de Progreso, Calceta, Shushufindi y Shell. 96 especímenes corresponden a *Lutzomyia* macho (43,2%), 87 a hembras sin alimentar (39,2%) y 39 hembras con ingesta sanguínea (17,6%). Sólo las hembras alimentadas fueron usadas para la identificación morfológica y de ingesta sanguínea (Tabla 7).

Tabla 7

Sitios de colecta, número total de especímenes colectados y porcentaje de hembras alimentadas.

Localidades (Provincia)	Total Machos	Total Hembras sin alimentar	Total Hembras alimentadas	Total colecta	Porcentaje de hembras alimentadas
Progreso (Guayas)	6	3	9	18	50%
Calceta (Manabí)	59	40	14	113	12,4%
Shushufindi (Sucumbíos)	19	29	10	58	17,2%
Shell (Pastaza)	12	15	6	33	18,2%
Total	96	87	39	222	17,4%

Se utilizaron dos tipos de trampas CDC para las colectas, de luz normal y de luz ultravioleta. El conteo de flebótomos mostró un total de 89 especímenes colectados en las trampas de luz normal (40%) y 133 colectadas con trampas de luz ultravioleta (60%) (Figura 14).

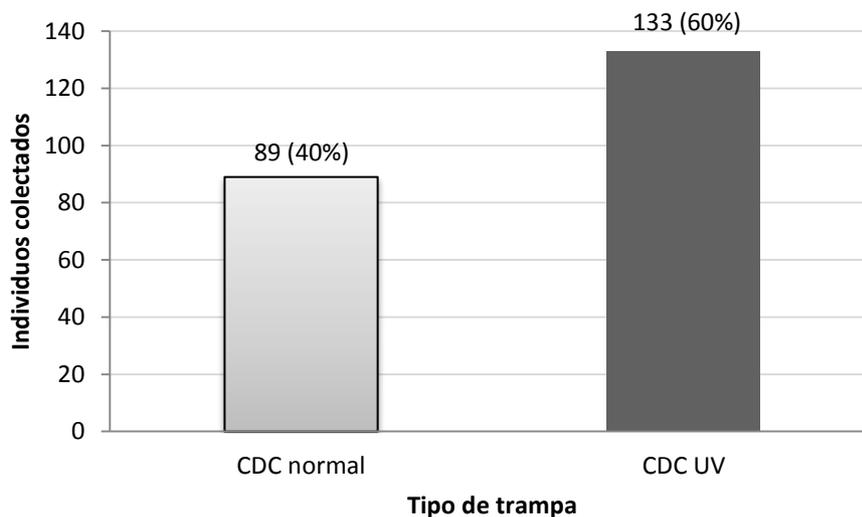


Figura 14. Total de flebótomos colectados en campo tanto con trampa CDC de luz normal como con trampa CDC de luz ultravioleta.

Los resultados por cada localidad se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Número de individuos colectados divididos por tipo de trampa, sexo y estado alimenticio.

Localidad (Provincia) Tipo de trampa		Progreso (Guayas)	Calceta (Manabí)	Shushufindi (Sucumbíos)	Shell (Pastaza)
		<i>Machos</i>	1	19	6
Luz Normal	<i>Hembras sin ingesta</i>	1	12	17	9
	<i>Hembras con ingesta</i>	4	7	5	4
	Total	6	38	28	16
	<i>Machos</i>	5	40	13	9
Luz Ultravioleta	<i>Hembras sin ingesta</i>	2	28	12	6
	<i>Hembras con ingesta</i>	5	7	5	2
	Total	12	75	30	17

En el análisis de colecta por localidades se ha determinado, que a pesar de haber colectado un mayor número de flebótomos con trampas CDC de luz ultravioleta, la cantidad de hembras con ingesta es similar, tanto con trampas de luz normal como de luz ultravioleta.

5.2 Identificación taxonómica de flebótomos

Las hembras flebótomos alimentadas colectadas en campo fueron identificadas de forma taxonómica, a través de la observación de las estructuras internas del cibario y el abdomen, con ayuda de la clave taxonómica de Young y Duncan (1994). Como resultado se identificaron 9 especies correspondientes a 7 géneros. En la Tabla 9 se aprecia las especies identificadas.

Tabla 9
Especies identificadas de flebótomos.

Género	Especie	Cantidad identificada
<i>Lutzomyia</i>	<i>Helcocyrtomyia tortura</i>	11
<i>Micropygomyia</i>	<i>Micropygomyia cayennensis</i>	8
<i>Trichophoromya</i>	<i>Trichophoromya napoensis</i>	5
<i>Lutzomyia</i>	<i>Lutzomyia spp.</i>	4
<i>Brumptomyia</i>	<i>Brumptomyia spp.</i>	3
<i>Nyssomyia</i>	<i>Nysomyia yuilli yuilli</i>	2
<i>Psychodopygus</i>	<i>Psychodopygus davisii</i>	2
<i>Evandromyia</i>	<i>Evandromyia walkeri</i>	1
<i>Trichophoromya</i>	<i>Trichophoromya ubiquitousalis</i>	1
<i>Trichophoromya</i>	<i>Trichophoromya sp.</i>	1
<i>Psychodopygus</i>	<i>Psychodopygus paraensis</i>	1
Total		39

El 28,2% de las hembras con ingesta colectadas muy probablemente pertenecen a la especie *Helcocyrtomyia tortura*, siendo la especie más abundante, seguida por *Micropygomyia cayennensis* con un 20% y *Trichophoromya napoensis* con 12,8% de abundancia.

No se pudieron identificar las especie de algunos flebótomos, debido a que existía daño de estructuras importantes como cibario o espermateca, lo que impidió la identificación.

Las especies identificadas en la Costa difieren de las especies de la Amazonía. A continuación en la Tabla 10, se muestran los resultados de las especies que fueron identificadas en las localidades de las dos regiones.

Tabla 10
Especies identificadas por localidad.

Especie	Localidad	Costa		Amazonía	
		Progreso	Calceta	Shushufindi	Shell
<i>Micropygomyia cayennensis</i>		8	-	-	-
<i>Helcocyrtomyia tortura</i>		1	10	-	-
<i>Psychodopygus paraensis</i>		-	1	-	-
<i>Nysomyia yuilli yuilli</i>		-	-	2	-
<i>Psychodopygus davis</i>		-	-	2	-
<i>Evandromyia walkeri</i>		-	-	1	-
<i>Trichophoromyia napoensis</i>		-	-	-	5
<i>Trichophoromyia ubiquitalis</i>		-	-	-	1
<i>Trichophoromyia</i> sp.		-	-	1	-
<i>Lutzomyia</i> spp.		-	1	3	-
<i>Brumptomyia</i> spp.		-	2	1	-

En la región Costa, las especies prevalentes fueron *Micropygomyia cayennensis*, *Helcocyrtomyia tortura* y *Psychodopygus paraensis* con un porcentaje de 34,8%, 47,8% y 4,3% respectivamente. Por otro lado en la Amazonía las especies más frecuentes fueron *Trichophoromyia napoensis*, con un porcentaje de 31,3%, *Nysomyia yuilli yuilli*, en un 12,5%, *Psychodopygus davis*, con 12,5%, *Evandromyia walkeri* en un 6,3% y *Trichophoromyia ubiquitalis* con 6,3%.

Entre todas las hembras con ingesta colectadas, tres de ellas fueron identificadas como *Brumptomyia* sp. que, a pesar de ser un tipo de flebótomo,

este no ha sido implicado como vector de *Leishmania* spp. Además, esta especie no presenta características morfológicas externas que lo diferencian de *Lutzomyia*, siendo imposible separarlos sin antes realizar un montaje.

5.3 Identificación de las fuentes alimenticias de flebótomos.

Se realizó la extracción de ADN a las 39 muestras de flebótomos alimentadas para determinar la fuente de ingesta sanguínea, a través de la amplificación del fragmento correspondiente al gen del citocromo B de vertebrados con un tamaño de 358 pb (Figura 15). 35 de las 39 muestras resultaron positivas para ingesta con vertebrados.

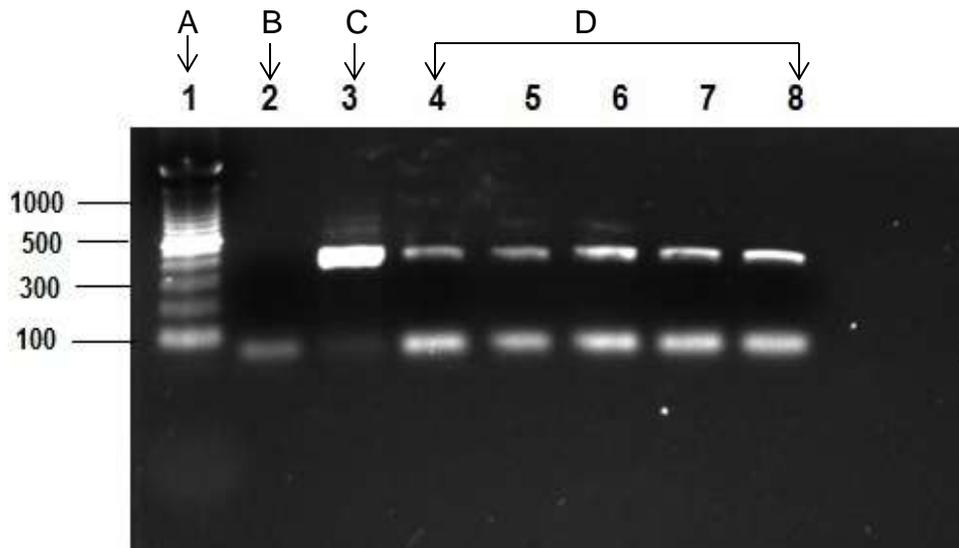


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del fragmento del gen citocromo B de vertebrados con un tamaño de 358 pb.
 a. Pocillo 1. Marcador de peso molecular.
 b. Pocillo 2. Control negativo.
 c. Pocillo 3. Control positivo.
 d. Pocillos 4-8. ADN de flebótomos hembra con ingesta sanguínea.

Posteriormente se realizó la amplificación del gen *cytB* del ADN mitocondrial de mamíferos domésticos como también de humanos mediante PCR múltiple. Este ensayo permite identificar las fuentes alimenticias del vector como también los posibles reservorios de *Leishmania*. En la Figura 16 se puede

apreciar las amplificaciones de los controles positivos de cabra (132 pb), cerdo (453 pb), perro (680 pb), vaca (561 pb) y humano (334 pb), de igual manera se muestra las amplificaciones de ADN de hembras flebótomo alimentadas.

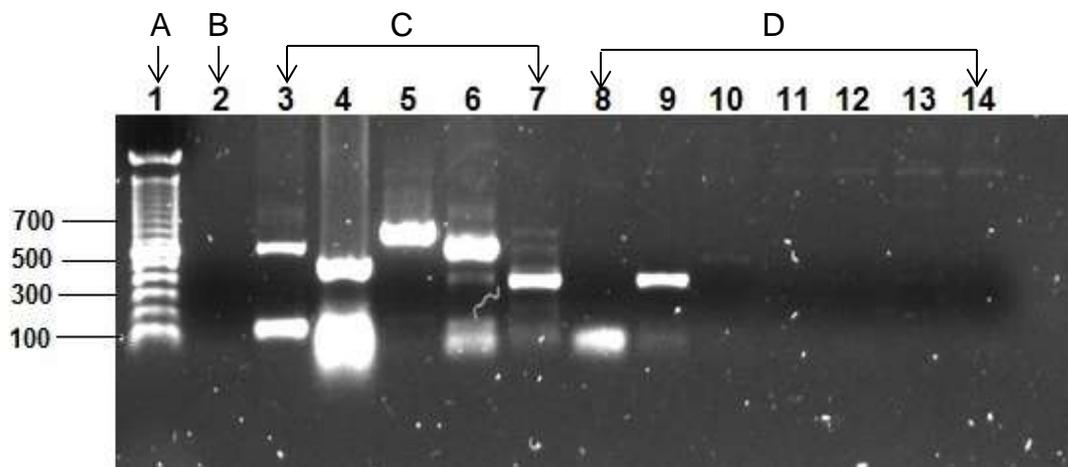


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la PCR múltiple de fragmentos de *cytB* de ADN mitocondrial de mamíferos domésticos y de humano.

- a. Pocillo 1. Marcador de peso molecular.
- b. Pocillo 2. Control negativo.
- c. Pocillos 3-7. Controles positivos (cabra, cerdo, perro, vaca, humano).
- d. Pocillo 8 -14. ADN de flebótomos hembra alimentadas.

Los resultados obtenidos tras el ensayo de PCR múltiple de ingesta sanguínea muestran que las hembras flebótomo se alimentaron de: sangre humana (19), vaca (1), perro (1) y cerdo (3). Ninguna hembra presentó ingesta con sangre de cabra en ninguna de las localidades.

Luego se prosiguió con el ensayo de amplificación del gen *cytB* del ADN mitocondrial de galliformes, dicho fragmento cuenta con 210 pares de bases tal como se puede observar en la electroforesis en gel de agarosa que se muestra en la Figura 17. Las 35 muestras con resultado positivo para vertebrados fueron analizadas en este experimento.

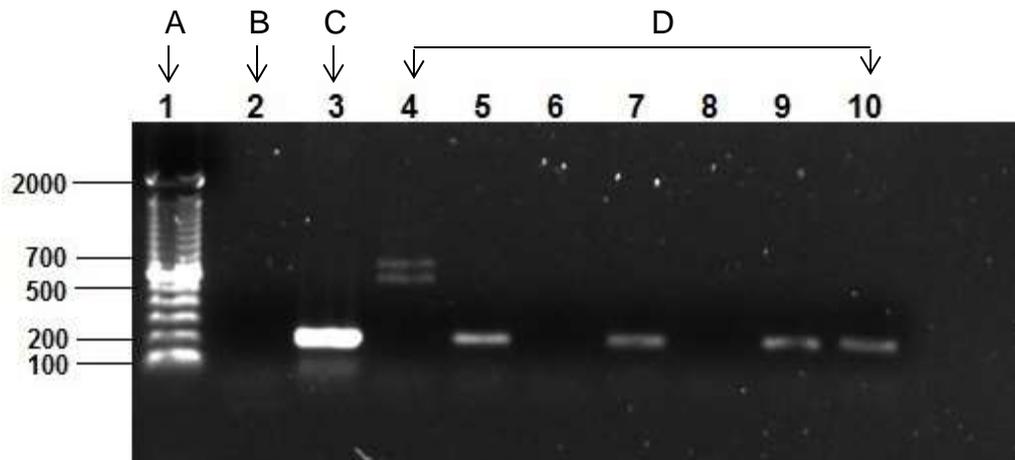


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación del fragmento del gen *cytB* de ADN mitocondrial de galliformes.

- a. Pocillo1. Marcador de peso molecular.
- b. Pocillo 2. Control negativo.
- c. Pocillo 3. Control positivo.
- d. Pocillos 4-10 ADN de flebótomos hembra alimentados

Una vez realizado el ensayo en el ADN de las hembras flebótomo alimentadas, el resultado obtenido es que 9 de 35 muestras fueron positivas para ingesta sanguínea de galliformes. Adicionalmente, en dos individuos se identificó la ingesta sanguínea tanto de galliformes como de mamíferos, en este caso de humanos.

Los resultados totales de ingesta sanguínea se presentan en la Tabla 11. El 89,7% de hembras alimentadas presentaron ingesta sanguínea de vertebrados, de las cuales el 2,8% de ellas corresponden a vaca, el 8,6% a cerdo, 2,8% a perro, el 54,3% a humano, el 25,7% a galliformes. Complementario un 5,7% de las muestras presentaron ingesta tanto de galliforme como de humano.

Tabla 11

Resultados y porcentajes de identificación de fuentes alimentarias.

Especie	Localidad	Fuente Alimentaria						
		Vert	Hum	Gall	Cerd	Vac	Per	Cabr
M. cayennensis	Progreso	+	+	-	-	-	-	-
M. cayennensis	Progreso	+	+	-	-	-	-	-
M. cayennensis	Progreso	+	-	+	-	-	-	-
M. cayennensis	Progreso	+	+	-	-	-	-	-
M. cayennensis	Progreso	+	-	+	-	-	-	-
M. cayennensis	Progreso	+	+	-	-	-	-	-
M. cayennensis	Progreso	+	+	-	-	-	-	-
H. tortura	Progreso	+	+	-	-	-	-	-
M. cayennensis	Progreso	+	-	-	-	-	-	-
H. tortura	Calceta	+	-	+	-	-	-	-
Brumtomia sp.	Calceta	+	+	-	-	-	-	-
H. tortura	Calceta	+	-	-	-	+	-	-
H. tortura	Calceta	+	-	-	+	-	-	-
H. tortura	Calceta	-	-	-	-	-	-	-
H. tortura	Calceta	+	+	-	-	-	-	-
Lutzomyia sp.	Calceta	+	+	-	-	-	-	-
Brumtomia sp.	Calceta	+	-	-	-	-	-	-
P. paraensis	Calceta	+	+	+	-	-	-	-
H. tortura	Calceta	+	-	-	+	-	-	-
H. tortura	Calceta	+	-	+	-	-	-	-
H. tortura	Calceta	-	-	-	-	-	-	-
H. tortura	Calceta	+	+	+	-	-	-	-
H. tortura	Calceta	+	-	+	-	-	-	-
N. yuilli yuilli	Shushufindi	-	-	-	-	-	-	-
Lutzomyia sp.	Shushufindi	+	-	-	+	-	-	-
P. davis	Shushufindi	+	+	-	-	-	-	-
Brumtomia sp.	Shushufindi	+	+	-	-	-	-	-
Lutzomyia sp.	Shushufindi	+	+	-	-	-	-	-
E. walkeri	Shushufindi	+	-	+	-	-	-	-
Lutzomyia sp.	Shushufindi	+	+	-	-	-	-	-
P. davis	Shushufindi	+	-	-	-	-	-	-
N. yuilli yuilli	Shushufindi	+	-	+	-	-	-	-
Lutzomyia sp.	Shushufindi	+	-	-	-	-	+	-
T. napoensis	Shell	-	-	-	-	-	-	-
T. ubiquitous	Shell	+	+	-	-	-	-	-
T. napoensis	Shell	+	+	-	-	-	-	-
T. napoensis	Shell	+	-	-	-	-	-	-
T. napoensis	Shell	+	+	-	-	-	-	-
T. napoensis	Shell	+	+	-	-	-	-	-
Total		35	19	9	3	1	1	0
Porcentaje		89,7%	54,3%	25,7%	8,6%	2,8%	2,8%	0%

Nota: Vert = Vertebrado; Hum = Humano; Gall = Galliforme; Cerd = Cerdo; Vac = Vaca; Per = Perro; Cabr = Cabra

El análisis por localidad mostró que en Progreso, las 9 muestras colectadas de hembras alimentadas resultaron ser positivas para ingesta de vertebrados (100%), de ellas, 6 muestras fueron positivas para humano (66,6%), 2 de ellas

para Galliformes (22,2%) y una fue negativa en todos los ensayos (11,1%). Ninguna hembra fue positiva para vaca, cerdo o perro (Figura 18)

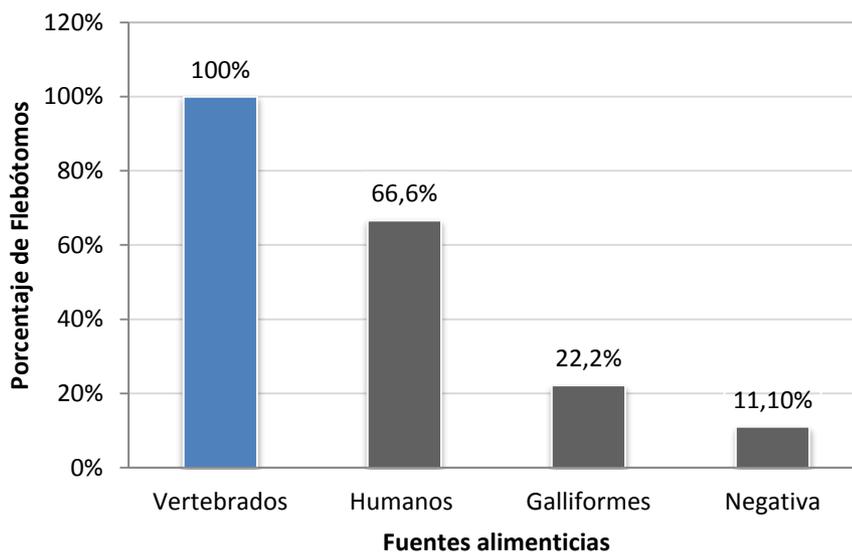


Figura 18. Porcentaje de muestras positivas y negativas para ingesta sanguínea de flebotomos hembra colectados en Progreso (Guayas).

En Calceta, 12 de las 14 muestras amplificaron para *cytB* de vertebrados (85,7%), de ellas 3 fueron positivas para ingesta de sangre humana (25%), 2 para cerdo (16,7%), 1 para vaca (8,3%) y 3 para galliformes (25%). De la misma manera, en esta localidad se identificó 2 hembras con ingesta conjunta de sangre galliforme y humana (16,7%), Además, una muestra fue negativa en todos los ensayos (8,3%). En la Figura 19 se muestra lo dicho anteriormente.

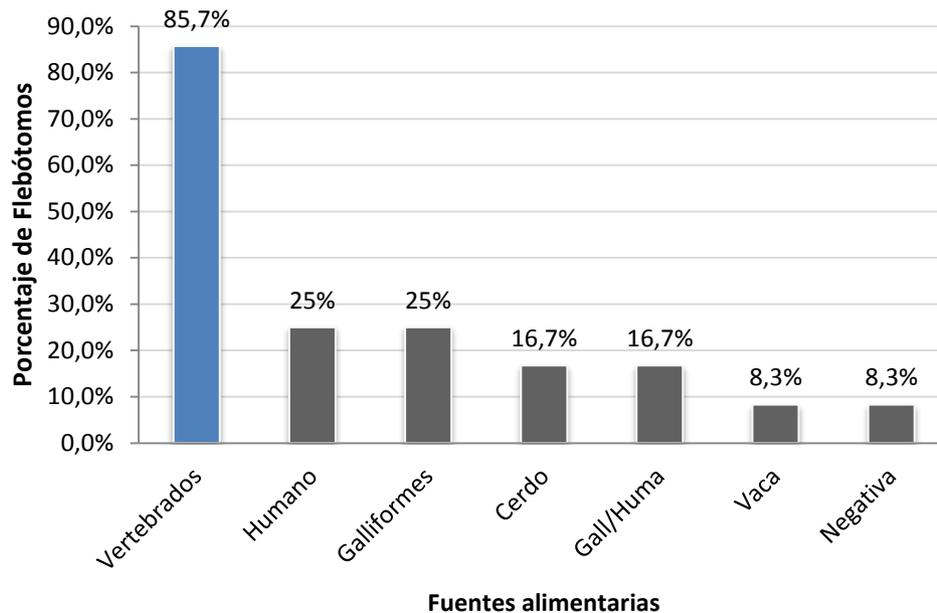


Figura 19. Porcentaje de muestras positivas y negativas de ingesta sanguínea de flebotomos hembra alimentadas colectados en Calceta (Manabi).

En la localidad de Shushufindi, 9 muestras fueron positivas para la amplificación del gen *cytB* de vertebrados (90%), de estas, 4 amplificaron para ingesta de sangre humana (44,4%), 1 para cerdo (11,1%), 1 para perro (11,1%) y 2 para galliformes (22,2%), una muestra no fue positiva para ingesta de mamíferos o Galliformes (11,1%), tal como se observa en la Figura 20.

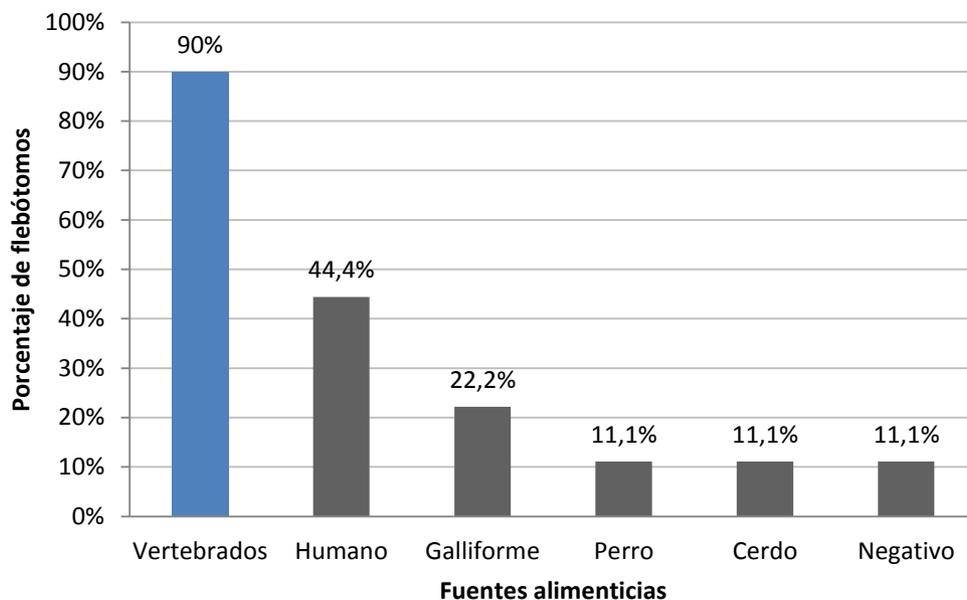


Figura 20. Porcentaje de muestras positivas para ingesta sanguínea de flebotomos hembra alimentados colectados en la localidad de Shushufindi en la provincia de Sucumbíos.

Finalmente en la localidad de Shell, 5 de 6 muestras de hembras flebotomo alimentadas fueron positivas para ingesta de sangre de vertebrados (83,3%), de estas, 4 fueron positivas para ingesta de sangre humana (80%), ningún otro individuo presento ingesta de vaca, cerdo, perro o galliformes (Figura 21).

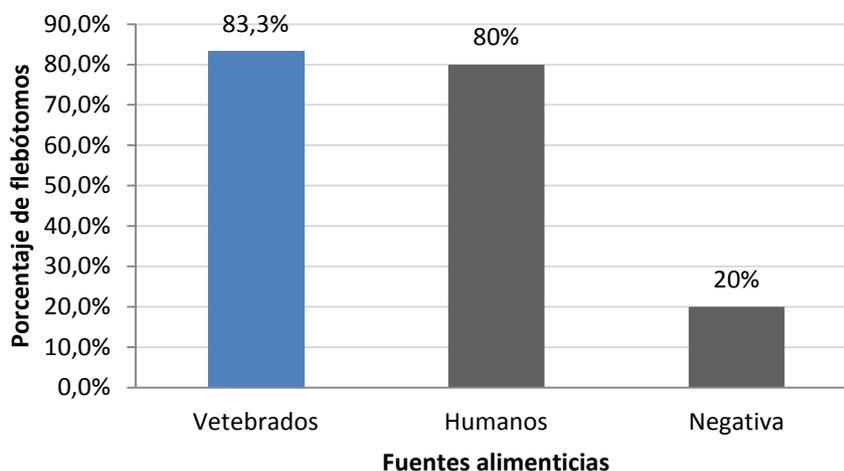


Figura 21. Porcentaje de muestras positivas para ingesta sanguínea de flebotomos hembra alimentadas colectadas en la localidad de Shell en la provincia de Pastaza

5.4 Identificación de infección por *Leishmania* en flebotomos.

Los primers específicos para ITS1 de Trypanosomatidae fueron usados para la identificación de la infección con *Leishmania*, en flebotomos hembra con ingesta sanguínea. Para ello, todas las hembras alimentadas colectadas (39) fueron sometidas a este ensayo usando el ADN extraído de las mismas. De ellas 13 (33,3%) muestras resultaron positivas en la amplificación, y 26 (66,6%) no tuvieron amplificación (Figura 22).

En la localidad de Progreso, 4 muestras fueron positivas (44,4%), es decir que las 5 muestras restantes fueron negativas. Los resultados de la secuenciación de dichas muestras positivas indicaron la presencia de *Leishmania mexicana* en una de las muestras y *Leishmania* sp. en las 3 restantes.

Las muestras correspondientes a la localidad de Calceta mostraron un 57% (8) de muestras positivas y un 43% (6) de negativas. La secuenciación indicó que las 8 muestras con resultado positivo contienen ADN de *Leishmania* sp.

En Shushufindi, de 10 muestras de flebótomos hembra alimentadas analizadas, solo una tuvo resultado positivo (10%), por lo tanto el 90% de las muestras resultaron negativas. La secuenciación indicó que la muestra positiva no corresponde a una especie de *Leishmania*, sino a un Trypanosomatidae diferente (*Crithidia fasciculata*).

Para los flebótomos colectados en Shell, ninguna de las muestras fue positiva. Estos resultados se los indica en la Tabla 12.

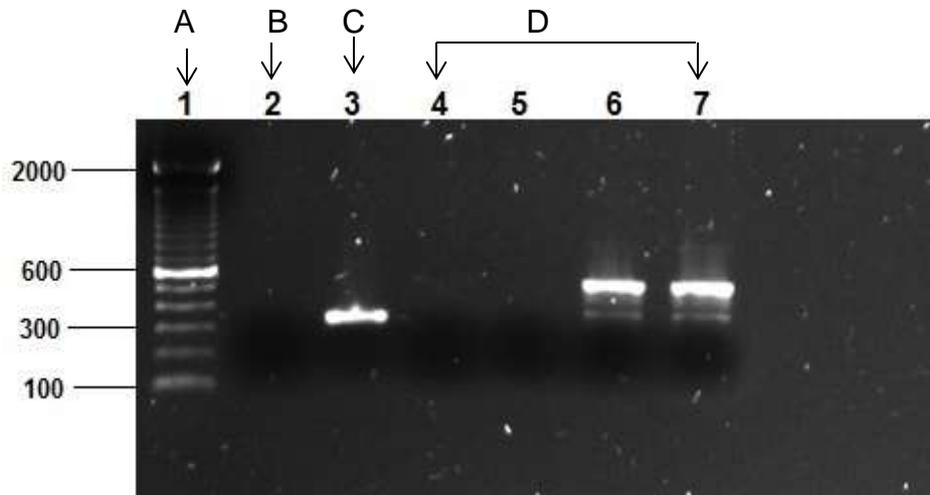


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa 1% de PCR para la amplificación del segmento ITS1 de Trypanosomatidae, en muestras de ADN extraído de flebótomos hembras alimentadas.

- a. Pocillo 1. Marcador de peso molecular.
- b. Pocillo 2. Control negativo.
- c. Pocillo 3. Control positivo.
- d. Pocillos 4-7. Muestras de ADN de flebótomos alimentados.

Tabla 12

Especies de parásitos identificados mediante secuenciación en cada localidad de muestreo

Localidad (Provincia) \ Especie	<i>Leishmania</i> sp.	<i>Leishmania mexicana</i>	<i>Crithidia fasciculata</i> (Trypanosomatidae)
Progreso (Guayas)	3	1	-
Calceta (Manabí)	8	-	-
Shushufindi (Sucumbíos)	-	-	1
Shell (Pastaza)	-	-	-

La mayor frecuencia de infección por *Leishmania* se detectó en flebótomos de las especies *Helcocyrtomyia tortura* con un 38,5% (5 positivos para *Leishmania* sp.) y *Mycropygomyia cayennensis* con 30,8% (3 positivos para *Leishmania* sp y 1 para *Leishmania mexicana*), seguidos por *Psychodopygus paraensis* con el 7,7 % de frecuencia (1 muestra positiva para *Leishmania* sp.). Un individuo *Lutzomyia* de la especie *Psychodopygus davisii* presentó la muestra positiva correspondiente para *Crithidia fasciculata*. Adicionalmente a dos ejemplares del género *Brumptomyia* sp. se les detecto infección por *Leishmania* sp. (Tabla 13).

Tabla 13

Porcentaje de infección por Trypanosomatidae en flebótomos

Flebótomo	<i>Leishmania mexicana</i>	<i>Leishmania</i> sp.	<i>Crithidia fasciculata</i>	Porcentaje
<i>Helcocyrtomyia tortura</i>	-	5	-	38,5 %
<i>Mycropygomyia cayennensis</i>	1	3	-	30,8%
<i>Psychodopygus paraensis</i>	-	1	-	7,7%
<i>Psychodopygus davisii</i>	-	-	1	7,7%
<i>Brumptomyia</i> sp.	-	2	-	15,4 %

5.5 Discusión

5.5.1 Colecta e identificación taxonómica de flebótomos

Existen varios métodos de colecta de flebótomos que implican trampas como tipo Shannon, trampas de luz CDC como también otros métodos que incluyen aspiradores o cebo humano y animal (Alexander, 2000, pp. 109-122; Alten *et al.*, 2015, pp. 664-678). En este estudio fueron usadas trampas CDC tanto de luz normal como de luz UV, con el fin de analizar la atracción que ejerce cada tipo de luz en los flebótomos. Como resultado, el 60 % del total de la colecta realizada en las 4 localidades corresponde a trampas de luz UV, frente al 30 % de colecta con trampas de luz normal, lo que corresponde a resultados reportados en estudios comparativos anteriores.

El estudio realizado por Kline y sus colaboradores en 2011 (Kline *et al.*, 2011, pp. 212-218) compara algunas variaciones en las trampas CDC en las que incluyen el color de la bolsa de recolección, el uso de sustancias atrayentes en la trampa como CO₂ y el tipo de luz usado. Sus resultados indican una mayor eficiencia de captura para las trampas con luz UV. Además, el número de individuos colectados aumenta si se incluye CO₂ como atrayente adicional a la trampa. Adicionalmente se demostró que con trampas de luz UV se logra una captura más abundante de hembras que de machos, lo que se evidencia en los resultados obtenidos en este trabajo, ya que se obtuvo un mayor número de hembras que de machos en 3 de las 4 localidades, siendo la excepción la localidad de Calceta, en la que el número de machos es mayor que el de hembras.

Otro estudio realizado en Ecuador (Hashiguchi *et al.*, 2014, pp. 163-170) compara la abundancia de captura con respecto a trampas CDC tradicionales, trampas Shannon tanto de luz normal como de luz ultravioleta y cebo humano. La forma más eficiente de captura registrada fue cebo humano, mientras que los tres tipos de trampa resultaron ser igual de buenos para la captura. Sin

embargo con la trampa de luz UV se logró la captura de un mayor número de individuos *Lutzomyia* que con la trampa de luz clara. Además se demostró la preferencia de algunas especies hacia la luz UV como fueron *Lu. panamensis*, *Lu. trapidoi* y *Lu. camposi*.

La identificación taxonómica ayudó a dilucidar que la especie con mayor abundancia en la región Costa es *Helcocyrtomyia tortura*, seguida de *Micropygomyia cayennensis* y *Psychodopygus paraensis*, mientras que en la Amazonía la especie más abundante fue *Trichophoromyia napoensis*, seguida por *Nysomyia yuilli yuilli*, *Psychodopygus davisii*, *Evandromyia walkeri*, y *Trichophoromyia ubiquitalis*. Todas las especies encontradas ya han sido registradas en el país. A pesar de ello, localidades como Calceta o Shell no han sido muestreadas con anterioridad pero los resultados son comparables si se toma en cuenta la provincia de cada localidad.

En la localidad de Progreso, la especie con mayor colecta de individuos fue *Micropygomyia cayennensis*. Esta especie ha sido reportada en provincias como El Oro, Esmeraldas, Los Ríos, Manabí, Loja y Guayas (Alexander, Takaoka, Eshita, Gómez y Hashiguchi, 1992, pp. 123-130). *Helcocyrtomyia tortura* fue encontrada en las localidades de Progreso y Calceta. Sin embargo los registros sólo las ubican en las Provincias de Morona Santiago, Orellana y Sucumbíos (Alexander *et al.*, 1992, pp. 123-130; Jones, Cohnstaedt, Beati, Terán, León y Munstermann, 2010, pp. 47-53; Hashiguchi *et al.*, 2014, pp. 163-170). La falta de estudios realizados en estas parroquias puede justificar la razón por la que esta especie no ha sido registrada aún en la Costa Ecuatoriana. La especie *Psychodopygus paraensis* encontrada también en la localidad de Calceta, ha sido reportada en provincias como Bolívar, Pastaza, Cañar y Manabí (Alexander *et al.*, 1992, pp. 123-130).

En las localidades de la Amazonía donde se realizaron las colectas, las especies con mayor frecuencia de aparición son: *Nysomyia yuilli yuilli* en la

localidad de Shushufindi, provincia de Sucumbíos. Esta especie ya ha sido registrada en esta localidad. De igual manera en otras provincias de la región amazónica como Orellana, Napo y Morona Santiago. La especie *Psychodopygus davisii* registrada también en la localidad de Shushufindi, ha sido identificada anteriormente en las provincias de Orellana, Morona Santiago, Napo, Pastaza y Sucumbíos. La especie con menos frecuencia de aparición en la localidad de Shushufindi fue *Evandromyia walkeri* con un individuo, la misma que ya fue registrada previamente en esta provincia y en la provincia de Napo (Young & Rogers, 1984, pp. 597-611; Alexander *et al.*, 1992, pp. 123-130; Hashiguchi *et al.*, 2014, pp. 163-170; Jones *et al.*, 2010, pp. 47-53).

En la localidad de Shell, provincia de Pastaza se identificaron dos especies, entre ellas esta *Trichophoromyia napoensis*, la cual se ha reportado en las provincias de Napo y Sucumbíos. La otra especie encontrada, *Trichophoromyia ubiquitalis* se ha registrado únicamente en la provincia de Morona Santiago (Young & Rogers, 1984, pp. 597-611; Alexander *et al.*, 1992, pp.123-130; Jones *et al.*, 2010, pp. 47-53).

Debido a que en nuestro país no se llevan a cabo muchos estudios sobre identificación de especies de flebótomos y los lugares de colecta no cubren toda la extensión nacional, no existe bibliografía suficiente que permita comparar toda la diversidad existente en Ecuador.

5.5.2 Identificación de fuentes alimenticias de flebótomos

En este estudio se analizó el gen citocromo B del ADN mitocondrial para la identificación del origen de la ingesta sanguínea. Este gen es uno de los más estudiados para filogenia y como un marcador apropiado para identificación de ingesta sanguínea de diferentes tipos de insectos antropofágicos.

En el estudio realizado, el 89,7% de las muestras fueron positivas para ingesta de vertebrados, las mismas que correspondieron a 35 muestras. Las muestras positivas para vertebrado fueron sometidas a la PCR múltiple para

identificación de la procedencia de la ingesta sanguínea, es decir si provenía de mamíferos domésticos y/o humanos. Los resultados fueron 19 ejemplares que se alimentaron de sangre de *Homo sapiens* (humano) (54,3%), 3 de sangre de *Sus scrofa* (cerdo) (8,6%), 1 de sangre de *Bos taurus* (vaca) (2,8%) y 1 de sangre de *Canis lupus familiaris* (perro) (2,8%). De la misma manera, a las 35 muestras se les realizó la PCR para identificación de ingesta sanguínea de galliformes en la cual 9 muestras fueron positivas (25,7%). Además 2 muestras presentaron ingesta doble tanto de galliformes como de sangre humana (5,7%). Los resultados indican que la mayoría de flebotomos colectados se alimentaron de sangre humana, repitiéndose esta tendencia en las 4 localidades de muestreo. Por otro lado, 4 muestras no amplificaron para ningún mamífero o galliforme, lo que podría significar que las hembras flebotomo se alimentaron de vertebrados silvestre.

Se han realizado varios estudios relacionados a la identificación de ingesta sanguínea de flebotomos alrededor del mundo, algunos de ellos presentando énfasis en las especies de flebotomos vectores más importantes. Ejemplo de ello es el trabajo realizado por Abbasi y sus colaboradores (Abassi, Cunio & Warburg, 2009, pp. 79-86), en el que se estudió las fuentes alimenticias de hembras *Phlebotomus papatasi* capturadas en trampas luminosas CDC, mediante PCR-RLB (Reverse line blot) la cual es una técnica acoplada que usa oligonucleótidos unidos covalentemente a una membrada de nailon, esta técnica, altamente sensible y reproducible estableció que la mayor cantidad de flebotomos estaban alimentadas de sangre humana, siendo un 50 % de las muestras, seguido por animales de corral como vacas y aves. Este estudio se lo realizó usando el gen de citocromo B como referencia.

En Sudamérica la mayoría de estudios sobre fuentes alimenticias de flebotomos se los ha realizado en Brasil. Trabajos basados en ensayos inmunológicos como los presentados por dos Santos-Afonso y colaboradores (dos Santos-Afonso, Castro, Valente & Ferreira, 2005, pp. 1816-1820; dos

Santos-Afonso *et al.*, 2011, pp. 1-5) en los que se usa tanto ensayos de aglutinación como ELISA, sus resultados indican una mayor ingesta de sangre de aves seguida de roedores y perros. Otros resultados basados en ensayos moleculares muestran que la principal dieta de los flebótomos hembra, como es el caso de *Lu. longipalpis* capturadas de forma salvaje en localidades de Brasil, son gallinas con un 70,7%, seguido de un 3,4% de sangre de perro (Sant'Anna *et al.*, 2008, pp. 230-237).

Un estudio previo realizado en Ecuador, específicamente en la localidad de Valle Hermoso perteneciente a la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, se registró la colecta de 106 hembras alimentadas de *Lutzomyia*, de las cuales el 94,3% (100 muestras) registraron ingesta de vertebrados; de estas el 77% presentaba ingesta de sangre derivada de aves; el 16% de mamíferos y el 7 % ingesta tanto de aves como de mamíferos. Con la PCR múltiple se pudo comprobar la presencia de sangre humana, de perro y de vaca. Sin embargo la ingesta predominante fue la de gallina con un 35,5% (Anaguano *et al.*, 2015, pp. 111-120). En la investigación presentada en este trabajo, la segunda fuente alimenticia de los flebótomos fue sangre de galliforme, corroborándose de esa manera el resultado obtenido en la publicación presentada anteriormente.

No todas las muestras sometidas al ensayo de PCR para la identificación de fuentes alimenticias fueron positivas. 4 de 39 muestras no tuvieron resultado para ingesta de sangre de vertebrados, además de las 35 muestras positivas para vertebrados, 4 de ellas no amplificaron para ningún mamífero o galliforme. Estos resultados negativos pueden deberse al proceso de digestión de la ingesta sanguínea, lo que provoca la pérdida de ADN o por la presencia de sangre de animales que no estuvieron seleccionados para la PCR de identificación de ingesta, es decir que el flebótomo no se haya alimentada de sangre de humano vaca, perro, cerdo, cabra o algún galliforme (Sant'Anna *et al.*, 2008, pp. 230-237; Haouas *et al.*, 2007, pp. 1054-1059; Garlapati *et al.*, 2012, pp. 515-521).

El comportamiento oportunista característico de los flebótomos es comprobado en este trabajo, ya que se basa en la disponibilidad alimenticia que existe en cada localidad de muestreo (Chaves *et al.*, 2010, pp. 2-11). En la localidad de Progreso y Shell, en las que se realiza poca o nula actividad agrícola, no se identificó mayor cantidad de ingesta de animales de ganado, siendo la sangre humana el mayor porcentaje de ingesta entre las hembras alimentadas.

El estudio de fuentes alimenticias en artrópodos hematófagos, como es el caso de los flebótomos, nos ayuda a obtener información de las preferencias alimenticias, como también de la capacidad vectorial, y debido a que la leishmaniasis es una enfermedad zoonótica, encontrar los reservorios silvestres de los que se alimenta el flebótomo vector es importante para entender el ciclo de transmisión en zonas endémicas, y aplicar estrategias de control eficientes (Haouas *et al.*, 2007, pp. 1054-1059; Paternina, 2012; Abassi, Cunio & Warburg, 2009, pp. 79-86).

5.5.3 Identificación de infección por *Leishmania* en flebótomos

Los 39 especímenes correspondientes a hembras flebótomos alimentadas fueron sometidas al ensayo de PCR para la amplificación del ITS1 de Trypanosomatidae. De ellas 13 resultaron positivas (33,3%). El análisis por localidad mostró que en Progreso, el 44,4% de los especímenes presentaban infección. La secuenciación indicó que una muestra estaba infectada por *Leishmania mexicana*, un agente causante de leishmaniasis cutánea. Las tres restantes se las identificó como *Leishmania* sp., ya que no se pudo identificar la especie debido a la baja calidad del ADN secuenciado. En Calceta, el 57% presentó infección por *Leishmania* sp. En Shushufindi solo una muestra (10%) fue positiva, la cual fue identificada como *Crithidia fasciculata*, un Trypanosomatidae no infectivo para humanos, relacionado de igual manera con vectores del orden Diptera (Alcolea, Alonso, García, Toraño, Larraga 2014, pp. 1-26). En la localidad de Shell ninguna muestra fue positiva.

La especie de flebótomos con mayor frecuencia de infección fueron *Helcocyrtomyia tortura* (38,5%), seguido de *Mycropygomyia cayennensis* (30,8%). Estudios realizados en Ecuador mostraron que existe relación entre el flebótomo *H. tortura* y el parásito *Leishmania (Viannia) naiffi*, uno de los causantes de leishmaniasis cutánea. Dicho estudio realizado por Kato y sus colaboradores (Kato *et al.*, 2008, pp. 438-440) indicó que las hembras *H. tortura* colectadas en localidades de la Amazonía ecuatoriana, presentan un alto grado de infección con el parásito (Kato, Calvopiña, Criollo & Hashiguchi, 2013, pp. 710-713).

En cuanto a la especie *Mycropygomyia cayennensis*, no hay estudios que respalden la interacción directa con una especie en particular de *Leishmania*. Sin embargo ha mostrado ser un vector importante de varias especies de protozoarios de la familia Trypanosomatidae (Cochero *et al.*, 2007, pp. 35-39).

Para que el análisis de ITS1 corrobore la presencia de *Leishmania* o cualquier otra microorganismo en específico, se deben realizar pruebas acopladas como es el caso de la PCR- RFLP (análisis con restricción de enzimas) o mediante secuenciación (Jaouadi *et al.*, 2011, pp. 1-3).

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

La colecta de flebótomos se la realizó con trampas CDC con dos tipos de luz, normal (amarilla) y ultravioleta (luz oscura). Se demostró que el tipo de luz más eficiente para la captura de individuos fue la luz UV, con la que se colectó un mayor número de insectos, entre ellos flebótomos. Sin embargo, si se toma en cuenta las hembras alimentadas con sangre, no existe una diferencia importante, ya que con las dos tipos de modificaciones de las trampas CDC se colectó un número parecido de hembras alimentadas, por lo tanto al momento de realizar el muestreo en campo para estudios de ingesta sanguínea de flebótomos, se puede usar cualquier tipo de luz sea clara u oscura y obtener resultados similares.

En la localidad de Calceta fue en donde se colectó la mayor cantidad de individuos. La razón es que el muestreo en zona peridomiciliar se lo realizó en un hacienda cacaotera la cual, según la literatura, es un hábitat idóneo para el desarrollo de flebótomos. Por lo tanto se concluye que la planta de cacao influye en la presencia de flebótomos.

Se logró identificar 7 géneros de flebótomos y 8 especies de *Lutzomyia* en 39 hembras de flebótomo alimentadas de 4 localidades muestreadas. En Progreso (Guayas) las especies encontradas fueron: *Mycropygomyia cayennensis* y *Helcocyrtomyia tortura*. En Calceta (Manabí) se encontraron las especies: *Helcocyrtomyia tortura* y *Psychodopygus paraensis*. Hasta el momento *H. tortura* no ha sido reportada en la Costa, por lo que representa el primer reporte de esta especie en la provincia y en la región en general, ya que solo ha sido identificada en provincias de la Amazonía. En Shushufindi (Sucumbíos) se identificaron las especies: *Nysomyia yuilli yuilli*, *Psychodopygus davis* y *Evandromyia walkeri*. Mientras que en Shell (Pastaza) las especies fueron: *Trichophoromyia napoensis* y *Trichophoromyia ubiquitalis*. Debido al bajo

número de muestras colectadas no se puede asegurar que una especie es más abundante en su respectiva localidad de muestreo, ya que por la disponibilidad de tiempo no fue posible una colecta que cubriese toda la extensión de cada localidad.

La principal fuente de ingesta sanguínea identificada fue sangre humana, seguida de sangre de galliformes, además de haber encontrado ingesta de sangre correspondiente a vaca, cerdo y perro. Por otro lado, la presencia de ingesta doble tanto de humano como de galliforme en la localidad de Calceta, es un indicio de que los animales del orden galliformes podrían ser hospederos de *Leishmania* spp.

El 33,3% de los flebótomos hembra colectados presentaron resultados positivos para ITS1 y mediante secuenciación, se detectó la presencia de *Leishmania mexicana* en una muestra y *Leishmania* sp. en las restantes. La mayoría de individuos con ingesta sanguínea de humano presentaron infección por *Leishmania*, incluyendo la identificada como *L. mexicana*. Las especies de flebótomos identificadas infectadas con el parásito en su mayoría son: *M. cayennensis* y *H. tortura*. Todas las especies identificadas en las localidades de la Amazonía no presentaron infección por *Leishmania*. Por tanto, esto sugiere que contraer leishmaniasis en las localidades de Shushufindi y Shell es poco probable, a diferencia de las localidades de la Costa, donde se encontró la mayor cantidad de infección en flebótomos. Sin embargo hace falta más pruebas para reforzar esta idea.

La presencia de *Leishmania* sp. en individuos del género *Brumptomyia* sp. no implica que este sea un vector, ya que no posee las características que lo incriminen como tal.

Los resultados que se presentan en este trabajo sobre la distribución geográfica, biología y ecología del vector, ayudan a incrementar el conocimiento sobre el ciclo epidemiológico de la leishmaniasis en el Ecuador,

lo que servirá para el futuro desarrollo de estrategias de control y prevención de la enfermedad en nuestro país.

6.2 Recomendaciones

A pesar de que el uso de trampas de luz tipo CDC fue exitoso, es recomendable el uso adicional de otros métodos de colecta como es las trampas Shannon o el cebo humano, lo que posiblemente ayudaría al incremento del número de muestras.

En el momento de la colecta, se recomienda tomar en cuenta más variables tales como la época de muestreo, los horarios de colocación de trampas, características ambientales como la temperatura y la humedad de la zona de colecta, como también la fase lunar.

Se recomienda el uso de medio semipermanente Euparal para realizar el montaje en placa, ya que el manejo es más sencillo y la observación por microscopía es más clara.

Se recomienda continuar con el estudio en localidades donde no se han realizado muestreos anteriormente para contribuir con información sobre nuevos registros de especies, tanto del parásito como del vector, y darles el seguimiento adecuado con el propósito de la creación de estrategias adecuadas para el control de la leishmaniasis por parte de los organismos de salud pertinentes.

REFERENCIAS

- 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 and Zoonotic Diseases*. 9(1), 79-86. Recuperado el 13 de octubre del 2016 de doi: 10.1089/vbz.2008.0064
- Alcaldía de Sucumbíos. (2016). *Shushufindi*. Recuperado el 31 de octubre de 2016 de <http://www.sucumbios.gob.ec/index.php/2015-10-20-00-03-09/2014-10-11-17-18-42/2014-10-17-14-29-30>
- Alcolea, P., Alonso, A., García, F., Toraño, A., y Larraga, V. (2014). An insight into the proteome of *Crithidia fasciculata* Choanomastigotes as a comparative approach to Axenic Growth, peanut lectin agglutination and differentiation of *Leishmania* spp. Promastigotes. *PLOS ONE*. 9(12), 1-26. Recuperado el 16 de julio de 2016 de doi: 10.1371/journal.pone.0113837
- Alexander, B. (2000). Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*. 14(2), 109-122. Recuperado el 13 de Agosto de 2016 de doi: 10.1046/j.1365-2915.2000.00237.X
- Alexander, J., Takaoka, H., Eshita, Y., Gómez, E., y Hashiguchi, Y. (1992). New records of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Ecuador. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 87(1), 123-130. Recuperado el 08 de enero de 2017 de [http://www.scielo.br/pdf/mioc/v87n1/vol87\(f1\)_116-123_100.pdf](http://www.scielo.br/pdf/mioc/v87n1/vol87(f1)_116-123_100.pdf)
- Ampuero, J. (2000). *Leishmaniasis*. Brasília, Brasil: Ministerio de Salud del Perú.
- Anaguano, D., Ponce, P., Baldeón, M., Santander, S., y Cevallos, V. (2015). Blood-meal identification in phlebotomine sand flies (Diptera:Psychodidae) from Valle Hermoso, a high prevalence zone

forcutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta Tropica*. 152(2015), 111-120. Recuperado el 02 de mayo del 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.09.004>

Andrade, P., y de la Cruz, J. (1999). Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Revista "Medicina"*. 5(2), 135-147. Recuperado el 14 de junio de 2016 de <http://rmedicina.ucsg.edu.ec/archivo/5.2/RM.5.2.14.pdf>

Arrivillaga, J., Ponce, P., y Cevallos, V. (2013). Primer registro de flebotominos para la provincia del Carchi en el Ecuador, *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Pshychodidae: Phlebotominae). *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 55(2), 198-201. Recuperado el 14 de junio de 2016 de: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/2513>

Atlen, B., Ozbel, Y., Ergunay, K., Kasap, O., Cull, B., Antoniou, M., Velo, E., Prudhomme, J., Molina, R., Bañuls, A., Schaffner, F., Hendrickx, G., Van Bortel, W., y Medlock. (2015). Sampling strategies for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Europe. *Bulletin of Entomological Research*. 105(6), 664-678. Recuperado el 24 de abril de 2016 de doi: <https://doi.org/10.1017/S0007485315000127>

Bejarano, E. (2001). Nuevas herramientas para la clasificación taxonómica de los insectos vectores de leishmaniosis: utilidad de los genes mitocondriales. *Biomédica. Revista del Instituto Nacional de Salud*. 21(2), 182-191. Recuperado el 15 de abril de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v21i2.1107>

Bomfante-Garrido, R., Urdaneta, R., Urdaneta, I., y Alvarado, J. (1990). Natural infection of *Lutzomyia trinidadensis* (díptera: psychodidae) with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 85(4), 477.

- Calvopiña, M. (2010). Leishmaniasis en Ecuador. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*. 35(1), 6-7 Recuperado el 15 de abril de 2016 de http://www.imbiomed.com/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_revista=203&id_seccion=3430&id_ejemplar=6562&id_articulo=65333
- Calvopiña, M., Armijos, R., y Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador: Current Status of Knowledge - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99(7), 663-672. Recuperado el 17 de agosto de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000700001>
- Carbone, F. *et al.* (2002). Manual de procedimientos de identificación de vectores de leishmaniasis y enfermedad de Carrión. Lima, Perú: Instituto Nacional de Salud.
- Chávez, L., Harrington, L., Keogh, C., Nguyen, A., y Kitron, U. (2010). Blood feeding patterns of mosquitoes: random or structured?. *Frontiers in Zoology*. 7(3), 2-11. Recuperado el 25 de septiembre de 2016 de doi: [10.1186/1742-9994-7-3](https://doi.org/10.1186/1742-9994-7-3)
- Claborn, D. (2010). The biology and control of leishmaniasis vectors. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2(2), 127-134. Recuperado el 25 de septiembre de 2016 de <http://www.jgid.org/text.asp?2010/2/2/127/62886>
- Cochero, S., Anaya, Y., Díaz, Y., Paternina, M., Luna, A., Paternina, L., y Bejarano, E. (2007). Infección natural de *Lutzomyia cayennensis cayennensis* con parásitos tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Los Montes de María, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 59(1), 35-39. Recuperado el 15 de abril de 2016 de scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S03750760200700010007

- Dawit, G., Girma, Z., y Simenew, K. (2013). A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *Bacteriology & Parasitology*. 4(2), 2-7. Recuperado el 20 de junio de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9597.1000166>
- Dos Santos, M., Castro, A., Valente, C., Ferreira, E., (2005). Studies on the feeding habits of *Lutzomyia* (N.) *intermedia* (Diptera, Psychodidae), vector of cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 21(6), 1816-1820. Recuperado el 20 de agosto de 2016 de doi: 10.1590/S0102-311X2005000600030
- Dos Santos, M., Duarte, R., Miranda, J., Caranha, L., y Ferreira, E. (2011). Studies on the feeding habits of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Journal of Tropical Medicine*. 2012(5), 1-5. Recuperado el 03 de enero de 2017 de doi: 10.1155/2012/858657
- Ferreira, T., Castro, T., Andrade, A., Oliveira, T., de Almeida, D., Takashi, M., Hecht, M., Nitz, N., y Gurgel, R. (2015). Molecular detection of *Trypanosoma* sp. and *Blastocrithidia* sp. (Trypanosomatidae) in phlebotomine sand flies (Psychodidae) in the Federal District of Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48(6), 776-779. Recuperado el 15 de diciembre de 2016 de doi: 10.1590/0037-8682-0076-2015
- García-Rejón, J. et al. (2010). Host-Feeding Preference of the Mosquito, *Culex quinquefasciatus*, in Yucatan State, Mexico. *Journal of Insect Science*. 10(32), 1-12. Recuperado el 10 de diciembre de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1673/031.010.3201>

- Garlapati, R., Abbasi, I., Warburg, A., Poché, D., y Poché, R. (2012). Identification of Bloodmeals in Wild Caught Blood Fed Phlebotomus argentipes (Diptera: Psychodidae) Using Cytochrome b PCR and Reverse Line Blotting in Bihar, India. *Journal of Medical Entomology*. 49(3), 515-521. Recuperado el 11 de noviembre de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1603/ME11115>
- Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial Progreso. (2016). Progreso. Recuperado el 31 de octubre de 2016 de <http://progreso.gob.ec/index.php/ct-menu-item-13>
- Gomez, E., Kato, H., Hashiguchi, Y. (2014). Man-biting sand fly species and natural infection with the Leishmaniapromastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. *Acta Tropica*. 140(2014), 41-49 Recuperado el 12 de abril de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.003>
- González, M., Benito, F., García, L., Iglesias, A. (2009). Leishmaniasis mucocutanea: una enfermedad importante con repercusión en ORL. *Elsevier Doymar*. 60(4), 298-300. Recuperado el 15 de abril de 2016 de doi:10.1016/j.otorri.2009.01.006
- Guamán, I., Armijos, M., y Manchero, J. (2013). Leishmaniasis Cutánea. *Revista Médica HJCA*. 5(2), 181-186. Recuperado el 11 de noviembre de 2016 de doi: 10.14410/2013.5.2.181
- Guayanlema, L. (2004). *Shell*. Recuperado el 31 de octubre de 2016 de <http://tierra.tutiempo.net/Ecuador/Shell-EC014821.html>
- Hamilton, J. (2008). Sandfly pheromones their biology and potential for use in control programs. *Parasite*. 2008(15), 252-256. Recuperado el 10 de abril de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2008153252>

- Haouas, N., Pesson, B., Boudabous, R., Dedet, J., 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. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 77(6), 1054-1059. Recuperado el 10 de julio de 2016 de <http://www.ajtmh.org/content/77/6/1054.long>
- Hashiguchi, K., Vélez, L., Kato, H., Criollo, H., Romero, D., Gómez, E., Martini, L., Zambrano, F., Calvopiña, M., Cáceres, A., y Hashiguchi, Y. (2014). Sand fly fauna (Diptera, Pcyhodidae, Phebotominae) in different Lishmaniasis-Endemic áreas of Ecuador, surveyed using a newly named Mini-Shanon trap. *Tropical Medicine and Health*. 42(4), 163-170. Recuperado el 14 de marzo de 2016 de doi: 10.2149/tmh.2014-20
- Jaouadi, K., Haouas, N., Chaara, D., Gorcii, M., Chargui, N., Augot, D., Pratlong, F., Dedet, J., Ettlijani, S., Mezhoud, H., y Babba, H. (2011). First detection of Leishmania killicki (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in Ctenodactylus gundi (Rodentia, Ctenodactylidae), a possible reservoir of human cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Parasites y Vectors* 4(159), 1-3. Recuperado el 10 de mayo de 2016 de doi: 10.1186/1756-3305-4-159
- Jones, L., Cohnstaedt, L., Beati, L., Terán, R., León, R., y Munstermann, L. (2010). New records of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Ecuador. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. 112(1), 47-53. Recuperado el 15 de abril de 2016 de doi: 10.4289/0013-8797-112.1.47
- Kato, H., Calvopiña, M., Criollo, H., Hashiguchi, Y. (2013). First human cases of *Leishmania (Viannia) naiffi* infection in Ecuador and identification of its suspected vector species. *Acta Tropica*. 128(3), 710-713. Recuperado el 20 de junio de 2016 de doi: 10.1016/j.actatropica.2013.09.001.

- Kato, H., Gómez, E., Yamamoto, Y., Calvopiña, M., Guevara, A., Marco, G., Barroso, P., Iwata, H., y Hashiguchi, Y. (2008). Short Report: Natural infection of *Lutzomyia tortura* with *Leishmania (Viannia) naiffi* in an Amazonian Area of Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 79(3), 438-440. Recuperado el 20 de julio de 2016 de <https://ir.kochi-u.ac.jp/dspace/bitstream/10126/3365/1/ajtmh7903438.pdf>
- Kent, R. (2009). Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Molecular Ecology Resources*. 9(4), 4-18. Recuperado el 20 de agosto de 2016 de doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02469.X
- Kent, R., y Norris, D. (2015). Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73(2), 336-342. Recuperado el 10 de junio de 2016 de <http://www.ajtmh.org/content/73/2/336.long>
- Killick-Kendrick, R. (1999). The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Clinics in Dermatology*. 17(3), 279-289. Recuperado el 20 de julio de 2016 de doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0738-081X\(99\)00046-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0738-081X(99)00046-2)
- Kline, D., Hogsette, J., y Müller, G. (2011). Comparison of various configurations of CDC-type traps for the collection of *Phlebotomus papatasi* Scopoli in southern Israel. *Journal of Vector Ecology* 36(1), 212-218. Recuperado el 21 de Agosto de 2016 de doi: 10.1111/j.1948-7134.2011.00133.x
- Lah, E., Ahamad, M., Subail, M., y Tze Ming, H. (2012). Establishment of a molecular tool for blood meal identification in Malaysia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(3), 223-227. Recuperado el 20 de mayo de 2016 de doi: 10.1016/S2221-1691(12)60046-X

- Maleki, N., Oshaghi, M., Javadian, E., Rassi, Y., Sadraei, J., y Mohtarami, F. (2009). Blood meal identification in gield-captured sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA assay. *Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases*. 3(1), 8-18. Recuperado el 20 de septiembre de 2016 de : PMC3385529
- Maroli. M., Feliciangeli, M., Bichaud, L., Charrel, R., y Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*. 27(2013), 123-147. Recuperado el 19 de agosto de 2016 de doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x
- Ministerio de Salud Pública (MSP). (2015). Gaceta epidemiológica semanal No.53. Recuperado el 20 de septiembre de 2016 de <http://intituciones.msp.gob.ec/imagenes/Documentos/gaceta/GACETA%20SE%2053.pdf>
- Montalvo, A., Fraga, J., Monzote, L., García, M., y Fonseca, L. (2012). Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista cubana de medicina tropical*. 64(2), 108-131. Recuperado el 05 de agosto de 2016 de https://www.researchgate.net/publication/262746043_Diagnostico_de_la_leishmaniasis_de_la_observacion_microscopica_del_parasito_a_la_deteccion_del_ADN
- Ngo, K., Kramer, D. (2003). Identification of Mosquito Bloodmeals Using Polymerase Chain Reaction (PCR) With Order-Specific Primers. *Journal of Medical Entomology*. 40(2), 215-222 Recuperado el 10 de julio de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-40.2.215>

- Ngo, K., y Kramer, L. (2003). Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. *Vector-Borne Diseases* 40(2), 215-222. Recuperado el 25 de mayo de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-40.2.215>
- Nieves, E., Sánchez, M., Rondón, M. (2013). Las proteínas salivales de los flebotominos en la transmisión del *Leishmania* y su impacto epidemiológico. *Avances en Biomedicina*. 2(1), 23-31. Recuperado el 04 de septiembre de 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331327927008>
- Olalla, H., Vélez, L., Kato, H., Hashiguchi, K., Cáceres, A., Gómez, E., Zambrano, F., Romero-Álvarez, D., Guevara, A., y Hashiguchi, Y. (2015). An analysis of reported cases of leishmaniasis in the southern Ecuadorian Amazon region, 1986–2012. *Acta Tropica*. 146(2015), 119-126. Recuperado el 15 de agosto de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.015>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2010). *Control de las leishmaniasis*. Italia: Organización Mundial de la Salud. Recuperado el 15 de septiembre del 2016 de http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Burden_distribution_VL_CL_2013.pdf?ua=1
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2013). *Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2013*. Recuperado el 15 de septiembre del 2016 de http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Burden_distribution_VL_CL_2013.pdf?ua=1

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015). *Leishmaniasis*. Recuperado el 12 de septiembre del 2016 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). *Leishmaniasis, Epidemiological situation*. Recuperado el 15 de septiembre del 2016 de <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/#>

Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2013). *Segunda reunión de gerentes de programas de leishmaniasis de las Américas*. Panamá: Organización Mundial de la Salud. Recuperado el 15 de septiembre del 2016 de http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Burden_distribucion_VL_CL_2013.pdf?ua=1

Passos-Dias, F., Seixas, E., y Macário, J. (2003). Blood feeding sources and peridomiciliation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad. Saúde Pública* 19(5), 1373-1380. Recuperado el 24 de octubre de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2003000500015>

Paternina, L. (2012). *Determinación molecular de las fuentes alimenticias de Lutzomyia spp. (Diptera: Psychodidae) asociadas a casos de Leishmaniasis Cutánea en el departamento de Sucre, Caribe Colombiano*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

Pérez, J., Villaseca, P., Llanos, A., Campos, M., Guerra, H. (1987). Técnicas para coleccionar "titiras" en ambientes altoandinos peruanos. *Revista peruana de entomología*. 30(1), 77-80

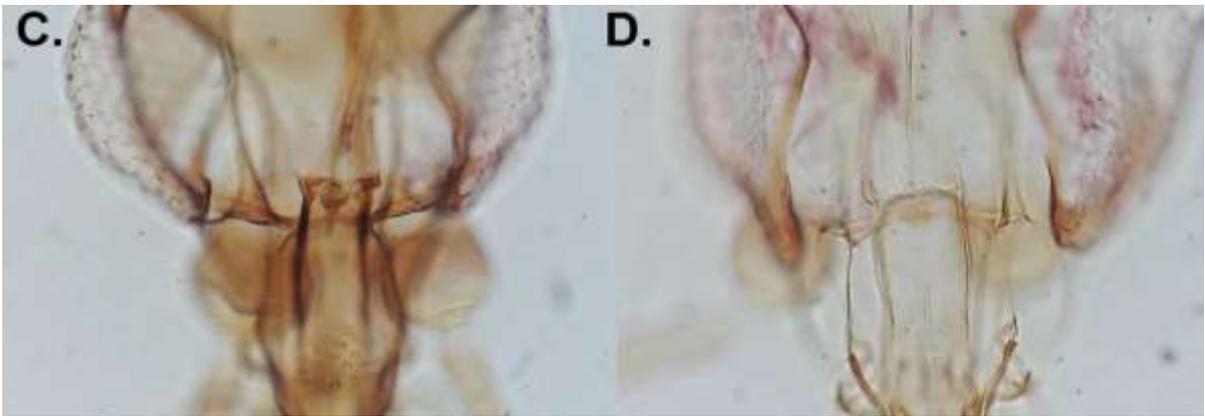
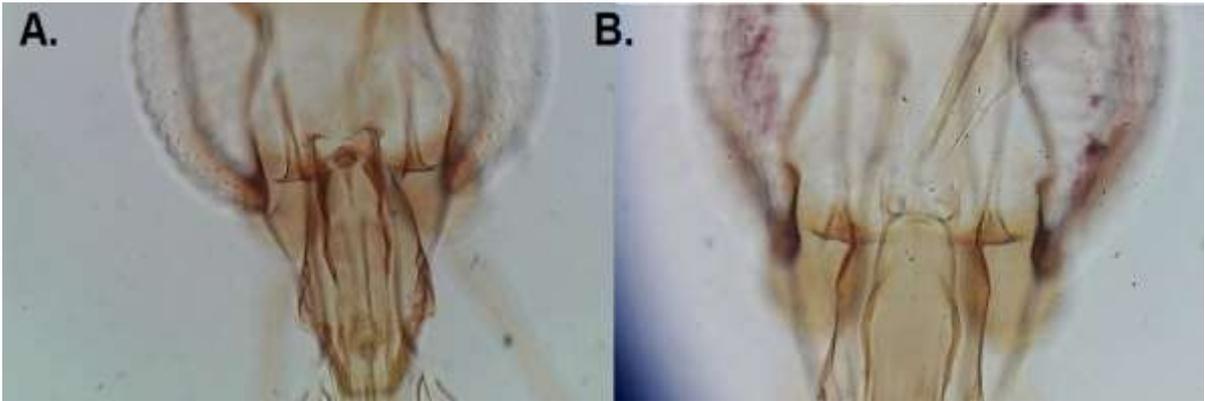
- Ruíz, J. (2010). Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 36(1), 62-65. Recuperado el 29 de septiembre de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.023>
- Russell, R., Otranto, D., y Wall, R. (2013). *The Encyclopedia of Medical and Meterinary Entomology*. (3ª ed.). Boston, Estados Unidos: CABI International.
- Salazar, N., Fernández, W., Iannacone, J., Morales, A., Espinoza, M. (2006). Comparación de dos métodos de colecta para Anophelinos (cebo humano y trampa de luz CDC), durante época seca y lluviosa, Yurimaguas, Perú 2005. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 23(2), 87-97. Recuperado el 21 de junio de 2016 de doi: <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2006.232.1067>
- Salomón, O. (2009) Vectores de Leishmaniasis en las Américas. *Gazeta Médica de Bahia*. 79(3), 3-15
- Sánchez, L., Sáenz, E., Pancorbo, J., Zegarra, R., Garcés, N., y Regis, A. (2004). *Educación Médica Continua*. 14(2), 82-98. Recuperado el 27 de mayo de 2016 de sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v14_n2/pdf/a02.pdf
- Sant'Anna, M., Jones, N., Hindley, J., Mendes, A., Dillon, R., Cavalcante, R., Alexander, B., Bates, P. (2008). Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Tropica*. 107(2008), 130-137. Recuperado el 09 de octubre de 2016 de doi: [10.1016/j.actatropica.2008.06.003](http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.003)

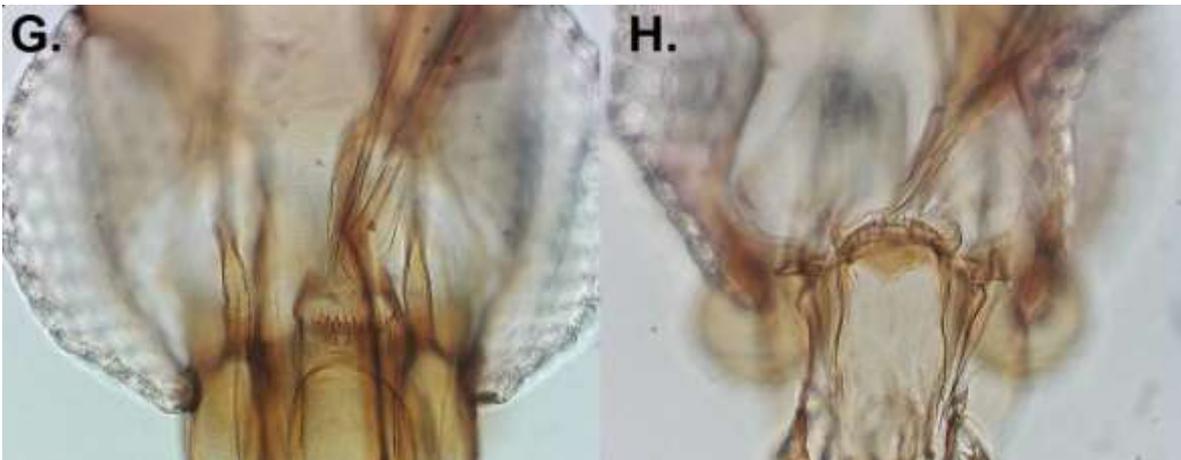
- Servise, M. (2008). *Medical Entomology for Students*. Liverpool, Reino Unido: Cambridge.
- Sharma, U., y Singh, S. (2008). Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *Journal Vector Borne Disease*. 45(4), 255-272). Recuperado el 04 de junio de 2016 de <http://www.mrcindia.org/journal/issues/454255.pdf>
- Tojal da Silva, A., Cupolillo, E., vulpini, A., Almeida, R., y Sierra, G. (2006). Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Tropical Medicine and International Health*. 11(9), 1388-1398. Recuperado el 20 de septiembre de 2016 de doi: 10.1111/j.1365-3156.2006.01695.X
- Torres, G. (2016). *Parroquia Calceta*. Recuperado el 31 de octubre de 2016 de <http://www.gadbolivar.gob.ec/historia.html>
- Vela, M. (2014). *Variación genética de Nyssomyia trapidoi (Diptera: Psychodidae) en tres zonas endémicas de leishmaniasis cutánea en el Ecuador*. (Tesis de grado). Universidad San Francisco de Quito.
- Wheeler, R., Gluenz, E., y Gull, K. (2011). The cell cycle of Leishmania: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Molecular Microbiology*. 79(3), 647-662. Recuperado el 31 de octubre de 2016 de doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07479.x
- Witremundo, J. (s.f.). *Leishmaniasis y sus vectores*. Recuperado el 5 de octubre de 2016 de <http://biosalud.saber.ula.ve/db/ssalud/edocs/articulos/Leishmaniasis.pdf>

Young, D., y Duncan, M. (1994). Guide to the identification and geographic distribution of lutzomyia sand flies in mexico, the west indies, central and south america (diptera: psychodidae). (1ª ed.). Florida, Estados Unidos: University of Florida.

Young, D., y Rogers, T. (1984). The phlebotomine sand fly fauna (diptera: psychodidae) of Ecuador. *Journal Medical Entomology* 21(5), 597-611.
Recuperado el 10 de octubre de 2016 de doi: 10.1093/jmedent/21.5.59

ANEXOS

Anexo 1. Cibario de flebótomos



A. *Micropygomyia cayennensis*

B. *Helcocyratomyia tortura*

C. *Psychodopygus paraensis*

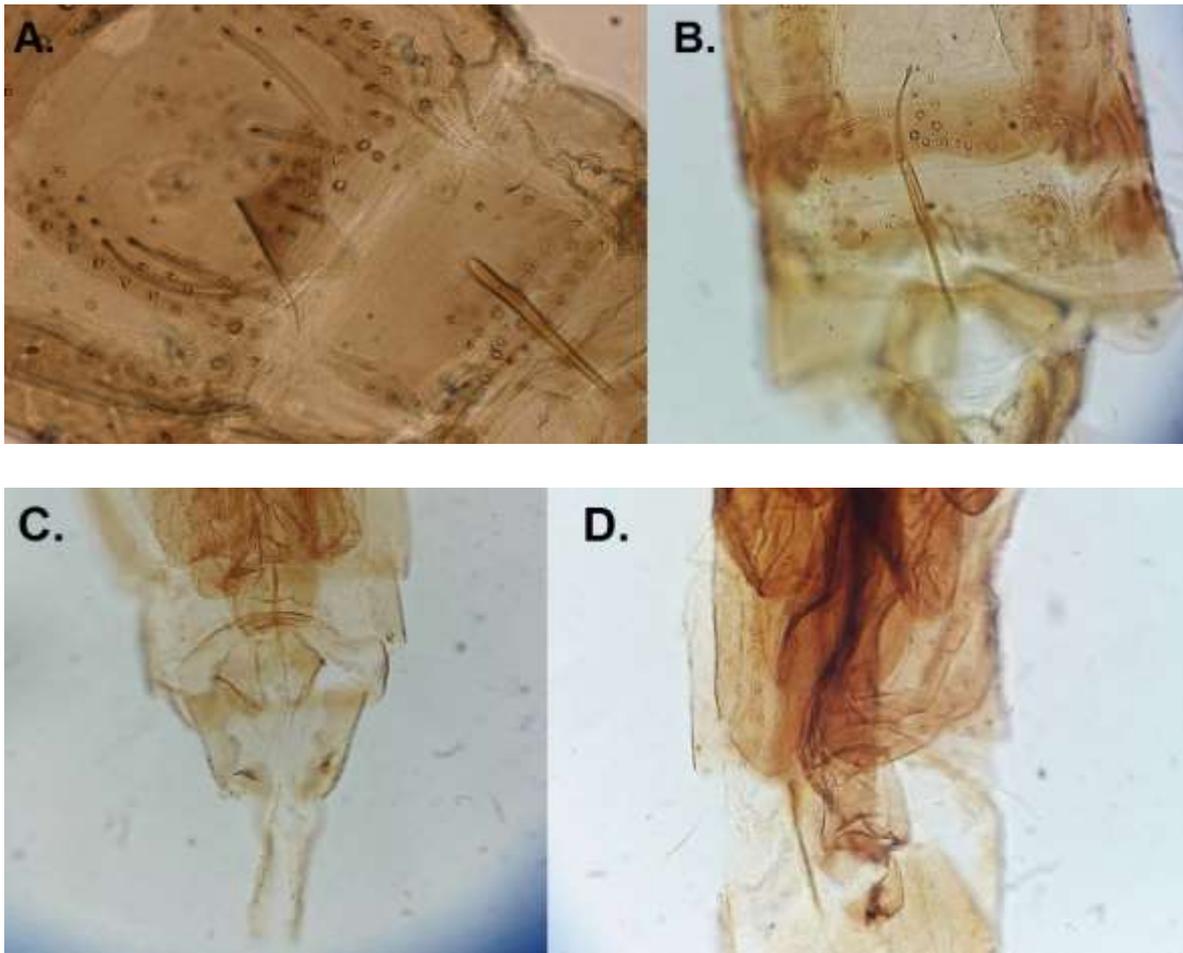
D. *Nysomyia yuilli yuilli*

E. *Psychodopygus davisii*

F. *Evandromyia walkeri*

G. *Trichophoromyia napoensis*

H. *Trichophoromyia ubiquitalis.*

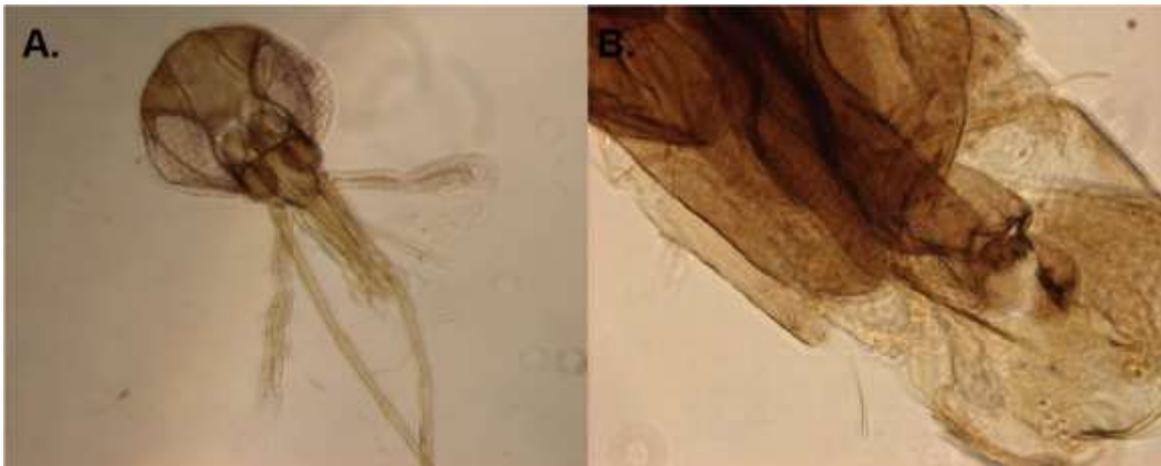
Anexo 2. Espermatecas de flebótomos.

A. *Trichophoromyia napoensis*

B. *Trichophoromyia ubiquitousalis.*

C y D. Abdomen ovado

Anexo 3. Género *Brumptomyia* sp.



A. Cabeza de *Brumptomyia* sp.

B. Abdomen de *Brumptomyia* sp.

