



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETECCIÓN MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES DE HOSPEDEROS
ALIMENTICIOS DE *LUTZOMYIA* E INFECCIÓN NATURAL CON
LEISHMANIA spp. EN LAS PROVINCIAS DE MORONA SANTIAGO,
PICHINCHA Y SUCUMBÍOS.

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

Profesor Guía



Ph.D. William Patricio Ponce Yaulema

Autora

Paola Isabel Ortega Alvarez

Año



2016





Declaraciones
centradas

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA



siguiente hoja
declaración corrector

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



William Patricio Ponce



Doctor de Filosofía.



CI: 1707786016



DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

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

Paola Isabel Ortega Alvarez
C.I. 1721875746

Bloque justificado hasta 35
caracteres
máximo mitad de la hoja
pegado margen inferior
3cm, margen derecho 3cm

AGRADECIMIENTOS



Agradezco a Dios por darme la sabiduría necesaria para poder desarrollar este trabajo, a mi familia por su apoyo incondicional.



A los Dres. Patricio Ponce, Manuel Baldeón y todos los que conforman el Centro de investigación CIT, a Varsovia Cevallos Ph.D. directora del Proyecto financiado por la Senescyt "Sistema nacional de vigilancia y alerta temprana para la malaria y leishmaniasis (SATVEC-FASE 1) del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), por sus enseñanzas y disposición cuando lo necesite, a la Universidad de las Américas y a mis maestros e investigadores por formarme profesionalmente.

3cm

} 3 cm .

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, Galito y Cecy, a mis hermanos Anita y Galito, a Marthy, gracias por su ejemplo, su amor y apoyo incondicional. A Paty, Gus, Salo, David, Liz, Jenny, Moni, Cris N., gracias por su amistad durante este trayecto y cada momento compartido.

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa que se transmite a través de insectos flebótomos del género *Lutzomyia*. En Suramérica, la leishmaniasis cutánea es una enfermedad endémica, presente en gran parte de los países que conforman el continente (Amóra, et al., 2009; Maroli, et al., 2013). La primera investigación sobre fuentes de sustento de flebótomos y proporción de identificación e infección de los vectores, se realizó en Valle Hermoso en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas (Anaguano et al., 2015). El presente estudio se llevó a cabo en Macas, provincia Morona Santiago, Lumbaquí, provincia Sucumbíos y en Puerto Quito, provincia Pichincha. El objetivo fue identificar las especies de flebótomos que habitan en cada localidad, determinar sus fuentes alimenticias y detectar la infección natural de *Leishmania sp.p.* en las hembras con ingesta. Se identificaron siete géneros de flebótomos: *Pressatia*, *Nyssomyia*, *Psychodopygus*, *Lutzomyia*, *Trichophoromyia* y *Micropygomyia*. Se colectaron 146 hembras de flebótomos con ingesta. Se identificaron ingestas del orden galliforme (71.2%), ingestas en mamíferos, principalmente en cerdos (17.8%), humanos (15.8%), perros (12.3%) y vacas (6.1%), además en otros mamíferos silvestres no identificados (10.3%) y en otros vertebrados no identificados (7.5%). Se detectó infección de *Leishmania spp.* en el 45% de hembras colectadas. Se detectó una clara tendencia de los flebótomos por alimentarse de sangre de aves del orden galliforme, esto se observó en las tres localidades muestreadas. *Pressatia spp.* fue el género más común, y además, presentó el mayor porcentaje de infección y mayor frecuencia de ingesta aviar. Este estudio proporciona información de la distribución, biología y ecología de las especies de flebótomos, lo cual constituye una base para la toma de decisiones en cuanto a acciones de prevención, protección y control de la enfermedad en las localidades analizadas.

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




ABSTRACT



Leishmaniasis is a tropical disease transmitted by sandflies. In South America, cutaneous leishmaniasis is endemic in most countries of the continent (Amora et al., 2009; Maroli, et al., 2013). The first study on food sources of flebotoms was done at “Valle Hermoso” in Santo Domingo de los Tsáchilas province (Anaguano et al., 2015). This study was conducted in three locations: Macas, Morona Santiago province, Lumbaquí in Sucumbios and Puerto Quito in Pichincha Province; in order to identify the species of sand flies that live in each locality, determine their food sources and detect natural infection of *Leishmania* spp in engorged females. Seven genera of flebotoms were identified: *Pressatia*, *Nyssomyia* *Psychodopygus*, *Lutzomyia*, *Trichophoromyia* and *Micropygomyia*. A total of 146 female sandflies with intake were collected, that fed on galliforme (71.2%), pig (17.8%), human (15.8%), dog (12.3%), cow (6.1%), unidentified vertebrates (7.5%) and unidentified mammals (10.3%). *Leishmania* spp. infection was detected in 45% of females collected. Sandflies showed a trend to feed on birds in the three locations. *Pressatia* spp. was identified as the most common genus, and also with the highest percentage of infection and highest frequency of avian intakes. The study provides information regarding the distribution, biology and ecology of the species, which is a basis for decision-making regarding actions of prevention, protection and control of disease in communities analyzed.

Keywords: Leishmaniasis, sandflies, natural infection, PCR, power supply.



ÍNDICE

		
Capítulo I. Introducción.....		① Letra 12
1.1 Formulación del Problema		1
1.2 Justificación		3
1.4 Objetivos.....		4
1.4.1 Objetivo General		4
1.4.2 Objetivos específicos		4
Capítulo II. Marco Teórico		5
2.1. Leishmaniasis		5
2.1.1. Generalidades.....		5
2.1.2. Distribución geográfica		7
2.1.3. Epidemiología		10
2.1.3.1 Leishmaniasis cutánea		11
2.1.3.2 Leishmaniasis muco-cutánea		12
2.1.3.3 Leishmaniasis visceral		12
2.2. Flebótomos		13
2.2.1. Apariencia y comportamiento		13
2.2.2. Distribución del vector.....		15
2.2.3. Biología del vector		15
2.2.5 Fuentes de alimentación de los flebótomos		16
Capítulo III. Metodología		18
3.1 Instituciones participantes		18
3.2 Procedimientos		18
3.2.1 Áreas de estudio		18
3.2.2 Recolecta de flebótomos en campo.....		21
3.2.3 Procesamiento, montaje e identificación taxonómica de flebótomos		25
3.2.4 Extracción de ADN total.....		27

3.2.5 Amplificación de ADN de ingestas alimentarias.....	28
3.2.5.1 Amplificación de ADN mitocondrial de vertebrados.....	28
3.2.5.2 Amplificación de ADN nuclear de mamíferos	29
3.2.5.3 Amplificación de ADN mitocondrial de mamíferos domésticos...	30
3.2.5.4 Amplificación de ADN mitocondrial de Galliforme	31
3.2.5.5 Amplificación de ADN de <i>Leishmania spp.</i>	31
3.2.5.6 Espaciador Transcrito Interno Ribosomal (ITS).....	32
3.2.6 Electroforesis de ADN en gel de agarosa	32
Capítulo IV. Resultados	34
4.1 Composición taxonómica de los flebótomos con ingesta sanguínea.....	34
4.2 Detección de infección natural con <i>Leishmania spp.</i> de los flebótomos	42
4.1 Determinación de las fuentes alimenticias de los flebótomos.....	44
Capítulo V. Discusión.....	50
5.1 Composición taxonómica de flebótomos	50
5.2 Detección de infección natural con <i>Leishmaniasis spp.</i> en los flebótomos.....	53
5.3 Detección de fuentes alimentarias de los flebótomos	54
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	57
6.1 Conclusiones	57
6.2 Recomendaciones	58
REFERENCIAS	59
ANEXOS 	72 

ÍNDICE DE FIGURAS


Figura 1. Mapa de zonas endémicas de leishmaniasis cutánea a nivel mundial 	9
Figura 2. Mapa de la zona de colecta en la provincia de Morona Santiago	19
Figura 3 .Mapa de la zona de colecta en la provincia Pichincha	20
Figura 4. Mapa de la zona de colecta en la provincia de Morona Santiago	21
Figura 5. Trampas de CDC de luz normal empleadas para la colecta de flebótomos en campo.....	22
Figura 6. Colecta de flebótomos.....	23
Figura 7. Ubicación de trampas en zona domiciliar	24
Figura 8. Ubicación de trampas en la zona peri-domiciliar.....	24
Figura 9. Ubicación de trampas en la zona de bosque.	24
Figura 10. Clasificación de los flebótomos por su condición y sexo para su posterior disección y montaje: a) Macho (25X), b) Hembra sin ingesta (15X) y c) Hembra con ingesta (30X))......	26
Figura 11. Distribución de la abundancia total de hembras por zonas de colecta en las localidades de Macas, Lumbaqui y Pto. Quito.	35
Figura 12. Abundancia relativa de las especies de flebótomos identificados en las localidades de Macas, Lumbaqui y Pto. Quito.	37
Figura 13. Abundancia total de especies colectadas en las localidades de Lumbaqui, Pto. Quito y Macas.....	40
Figura 14. Distribución de la frecuencia total de géneros de flebótomos en las diferentes elevaciones de las áreas de colecta.....	41
Figura 15. La línea 1, marcador molecular 100bp; línea 2, control negativo, línea 3- control positivo (Lutzomyia mexicana) línea 4-7, ADN de flebótomos con ingesta sanguínea, en gel de electroforesis (1%).	42

Figura 16. Especies y abundancia de especies total con infección de Leishmania spp. en las tres localidades analizadas.	44
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa (1%) del gen mitocondrial citocromo B de vertebrados muestra fragmentos (358bp) de ADN de flebótomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR.	44
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa (1%) del gen mitocondrial citocromo B de mamíferos muestra fragmentos (330bp) de ADN de flebótomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR.	45
Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa (1%) del gen mitocondrial citocromo B de vaca, perro, humano, cabra y cerdo de ADN de flebótomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR- multiplex.....	46
Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa (1%) del gen mitocondrial citocromo B del orden galliforme (201 bp) de ADN de flebótomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR-multiplex.	46
Figura 21. Fuentes de alimentación de los flebótomos registradas en las localidades de Macas, Lumbaqui y Pto. Quito.	47
Figura 22. Preferencias alimenticias de flebótomos de fuentes identificadas y no identificadas..	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado usadas para la amplificación con primers específicos para vertebrados.....	28
Tabla 2 . Concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado usadas para la amplificación con primers específicos para mamíferos.....	29
Tabla 3. Secuencias de los primers para la PCR Múltiplex.	30
Tabla 4. Concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado usadas para la amplificación multiplex con primers específicos para mamíferos domésticos y el primer universal UNREV 1025.	30
Tabla 5. Concentraciones de reactivos y condiciones de termociclado usadas para la amplificación con primers específicos para el orden galliforme.....	31
Tabla 6. Condiciones de PCR para la región ITS1 de Leishmania spp.	32
Tabla 7. Incidencia de hembras flebótomas con ingesta por zona de colecta en las localidades de Lumbaqui, Pto. Quito y Macas.	36
Tabla 8. Especies identificadas de flebótomos y abundancia total, colectadas en las localidades de Macas, Lumbaqui y Pto. Quito.	37
Tabla 9. Abundancia de especies de flebótomos colectados en Lumbaquí-Sucumbios.....	38
Tabla 10. Abundancia de especies de flebótomos colectados en Puerto Quito-Pichincha.....	39
Tabla 11. Abundancia de especies de flebótomos colectados en Macas-Morona Santiago.	39



Capítulo I. Introducción

1.1 Formulación del Problema

La leishmaniasis según *Guamán, et al. (2013)*, constituye un conjunto de enfermedades infecciosas causadas por un parásito protozooario intracelular de la familia *Tripanosomatidae* del género *Leishmania*. El protozooario del género *Leishmania* se transmite por moscas de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Calvopiña, et al., 2012). Esta enfermedad afecta preferentemente a los mamíferos, en especial a los perros y los humanos. El padecimiento presenta tres formas clínicas, que van desde lesiones muco-cutáneas y cutáneas, hasta afectación visceral (Nieves et al., 2014).

Esta enfermedad es considerada como la novena enfermedad de importancia de transmisión vectorial entre las enfermedades infecciosas individuales, no obstante, la leishmaniasis es catalogada como una “enfermedad olvidada” (Alvar et al., 2012). En Latinoamérica, tanto el diagnóstico prematuro como el control de la endemia poseen grandes retos y restricciones, uno de ellos es la falta de información sobre el tipo y frecuencia de los animales reservorio (Alvar et al., 2012; OMS, 2010; Salomón, 2009).

Se considera que el número de casos está subestimado en América del Sur, Según Alvar et al. (2012), y Hotez et al. (2007), se estima que en Brasil cada año se producen entre 20.000 a 40.000 muertes como consecuencia de la leishmaniasis, siendo este uno de los diez países con mayores reportes de la enfermedad. En el Ecuador y países vecinos como Perú, Colombia y Brasil, son pocos los recursos que se destinan para la prevención y control de la enfermedad. La falta de apoyo financiero en programas de investigación para el control y eliminación de la enfermedad, así como la carencia de un sistema adecuado de control vectorial se traduce en costos para la salud pública.

La leishmaniasis es considerada como frecuente en Ecuador, se registra que 23 de las 24 provincias del país han reportado casos de esta enfermedad, con aumento en su distribución y frecuencia (Guamán et al., 2013). Recientes investigaciones en Ecuador, en su generalidad, se han encaminado en el estudio del parásito, sus efectos en la salud humana y en la ecología del parásito (Ofelia, et al., 2011).

Según Salomón (2009), los pocos estudios realizados en Ecuador son el reflejo de la complejidad del desarrollo de estudios ecológicos, dado principalmente por la dificultad en la diferenciación de las especies y en la determinación de inoculaciones naturales.

Se ha evidenciado una correlación directa entre la presencia de varias especies de flebótomos, y de casos de leishmaniasis con las poblaciones rurales, donde el ganado se halla en las proximidades de las viviendas, lo que facilita la manutención oportunista del vector con sangre de animales y humanos (Davies et al., 2000).

Otros factores que inciden en la elevada frecuencia de transmisión, son las condiciones ambientales favorables para el desarrollo del vector, los cultivos de café y cacao que son un continuo de los bosques en las áreas endémicas y que constituyen zonas propicias para el desarrollo del vector (OMS, 2010). “La leishmaniasis puede transmitirse por jeringuillas compartidas entre consumidores de drogas intravenosas, por transfusiones de sangre y de forma congénita, de la madre al hijo, pero estos modos de transmisión son más raros que la transmisión por vectores” (OMS, 2010), es por ello que este trabajo se enfoca en la epidemiología de la leishmaniasis, la distribución y preferencias alimentarias del vector.

1.2 Justificación

El alimento sanguíneo de flebotominos determina el potencial biológico, reproductivo e incremento poblacional de flebótomos lo que influye en la capacidad vectorial.

En Ecuador, la única investigación sobre fuentes de alimentación e identificación de la infección en los individuos flebótomos, se realizó en la localidad de Valle Hermoso-Santo Domingo, zona hiperendémica de leishmaniasis (Anaguano et al., 2015).

Este trabajo se realizó en dos provincias con incidencia significativa de leishmaniasis, según datos del Ministerio de Salud Pública en el 2015.

Actualmente, el empleo de tecnologías moleculares posibilita la investigación efectiva de la conducta vector-hospedero y el desarrollo de mejores métodos para controlar el vector en la enfermedad (Anaguano et al., 2015; Kent et al., 2005; Sant'Anna et al., 2014). El manejo de técnicas a nivel molecular asentadas en PCR permiten la identificación de la presencia o ausencia de leishmania en los vectores, con ayuda de marcadores nucleares como es el caso de ITS se logra revelar de modo directo su infección (Abbasi, et al., 2009; Ken et al., 2005; Ngo et al., 2003; Sant'Anna et al., 2008).

Los resultados de esta investigación generan información para la construcción de bases de datos sobre las fuentes de infección original y alimentarias de los flebótomos con *Leishmania spp.* Esto incrementa el conocimiento de la epidemiología de esta enfermedad, la caracterización de hospederos implicados, los mecanismos de propagación y el conocimiento de la conducta ecológica del vector. Dicha información contribuirá a reforzar interpretaciones bioecológicas y bioepidemiológicas.

Esta información es fundamental para los sistemas de salud pública que trabajan en el control y disminución de la incidencia de leishmaniasis cutánea

en Ecuador, que durante los últimos años han registrado un mayor número de casos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Detectar mediante técnicas moleculares los hospederos de los que se alimentan los especímenes de *Lutzomyia* spp. y determinar la infección natural de *Leishmania* spp.

1.4.2 Objetivos específicos

- Identificar la diversidad de especies de *Lutzomyia* en las localidades de estudio.
- Determinar la procedencia de la ingesta sanguínea en hembras de *Lutzomyia* mediante el uso de Reacción de la Cadena Polimerasa Multiplex.
- Detectar la presencia de *Leishmania* en hembras de *Lutzomyia* mediante el uso de ITS1 en la Reacción de la Cadena Polimerasa.

Capítulo II. Marco Teórico

2.1. Leishmaniasis

2.1.1. Generalidades

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

A pesar de que existen polémica en cuanto a la clasificación taxonómica de las especies de flebótomos en América, la mayoría de los investigadores admiten la propuesta de Lewis et al. (1974) para los flebótomos de la región neotropical, seguida de la propuesta de Young y Duncan (1994), donde se reconocen tres géneros *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya* (Maroli et al., 2013; OMS, s.f.). Sin embargo, Galati (2003) en su revisión registró 464 especies de flebótomos, 23 géneros, 20 subgéneros y tres grupos de especies y 28 series (OMS,s.f.). *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) es un protozoo que origina un grupo de enfermedades identificadas como leishmaniasis (Claborn, 2010; Nicolas et al., 2002). La cual alberga dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, y su diferencia está dada por la zona donde se radica y desarrolla, específicamente en el tracto digestivo dentro del flebotomíneo. Según Calvopiña et al. (2012), estos vectores en el viejo mundo corresponden al género *Phlebotomus* y en el neotrópico al género *Lutzomyia*. Igualmente, la leishmaniasis posee una inmensa diversidad de huéspedes dentro de las especies de vertebrados (Dostálová y Volf, 2012).

“La leishmaniasis sigue siendo una de las enfermedades más desatendidas en todo el mundo, y afecta predominantemente a los más pobres, sobre todo en los países en desarrollo” (OMS, s.f.).

Esta enfermedad se manifiesta mayormente en las áreas rurales y suburbanas, donde el índice de pobreza y los contextos del sistema de salud son insuficientes (OMS, s.f.). Además, a esta problemática se puede incrementar aspectos como la perseverante migración interna, el crecimiento poblacional, la movilidad de personas buscando trabajo entre áreas endémicas de esta enfermedad y el incesante avance de proyectos petroleros en zonas donde el ciclo de propagación ha ido en aumento constante, lo cual incrementa el riesgo de contacto entre las personas, el vector y el parásito (Desjeux, s.f.).

En todo el mundo, 22 especies de *Leishmania* son clasificadas como patogénicas para el ser humano, de ellas, 15 están radicadas en el continente Americano (OPS, s.f.). La leishmaniasis posee una alta morbilidad en América y además presenta una extensa distribución, a su vez, su expansión zoonótica demanda varias especies de parásitos, vectores y reservorios (OPS y OMS, s.f.).

Por tales motivos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que la enfermedad en cuestión es una problemática de salud pública y una enfermedad tropical desatendida (OMS, s.f.).

En el caso de algunos países vecinos de Ecuador, como Brasil, la enfermedad se manifiesta en aproximadamente 3.000 nuevos casos reportados cada año, donde “los datos del 2011 muestran que la leishmaniasis cutánea llegó a 7,3 millones de personas en el norte, 5.200 en el noreste y 986 en el sudeste” (Saude, 2013); de igual manera, en Perú han sido reportados un promedio de 7.277 casos de leishmaniasis cutánea y 401 casos de la forma mucocutánea por año, esto en el periodo comprendido desde 2003 hasta 2013, donde el acumulado de casos asciende a los 84.462 reportes (Ministerio de Salud Perú, s.f.).

También se tienen referencias sobre el comportamiento de la enfermedad en Colombia, donde:

“(...) la Leishmaniasis representa un problema creciente de salud pública con un incremento significativo en la incidencia, pasando de un registro promedio anual de 6.500 casos a un promedio anual de casi 22.000 casos. Desde el 2002 se viene registrando un incremento de casos de leishmaniasis cutánea y según fuente del SIVIGILA desde el 2003 al 2007, se notificaron alrededor de 70000 casos, a partir de ese año se ha registrado una ligera disminución” (INS Colombia, s.f.).

En el año 1920, se diagnosticó el primer reporte de leishmaniasis en Ecuador (Zapata, Mejia, et al., 2012), en la actualidad es endémica en las regiones Sierra, Costa y Amazonía. Las áreas con condiciones climáticas que favorecen la presencia de los flebótomos se presentan a elevaciones entre 300 a 1500 metros sobre el nivel del mar (Armijos et al., 1997).

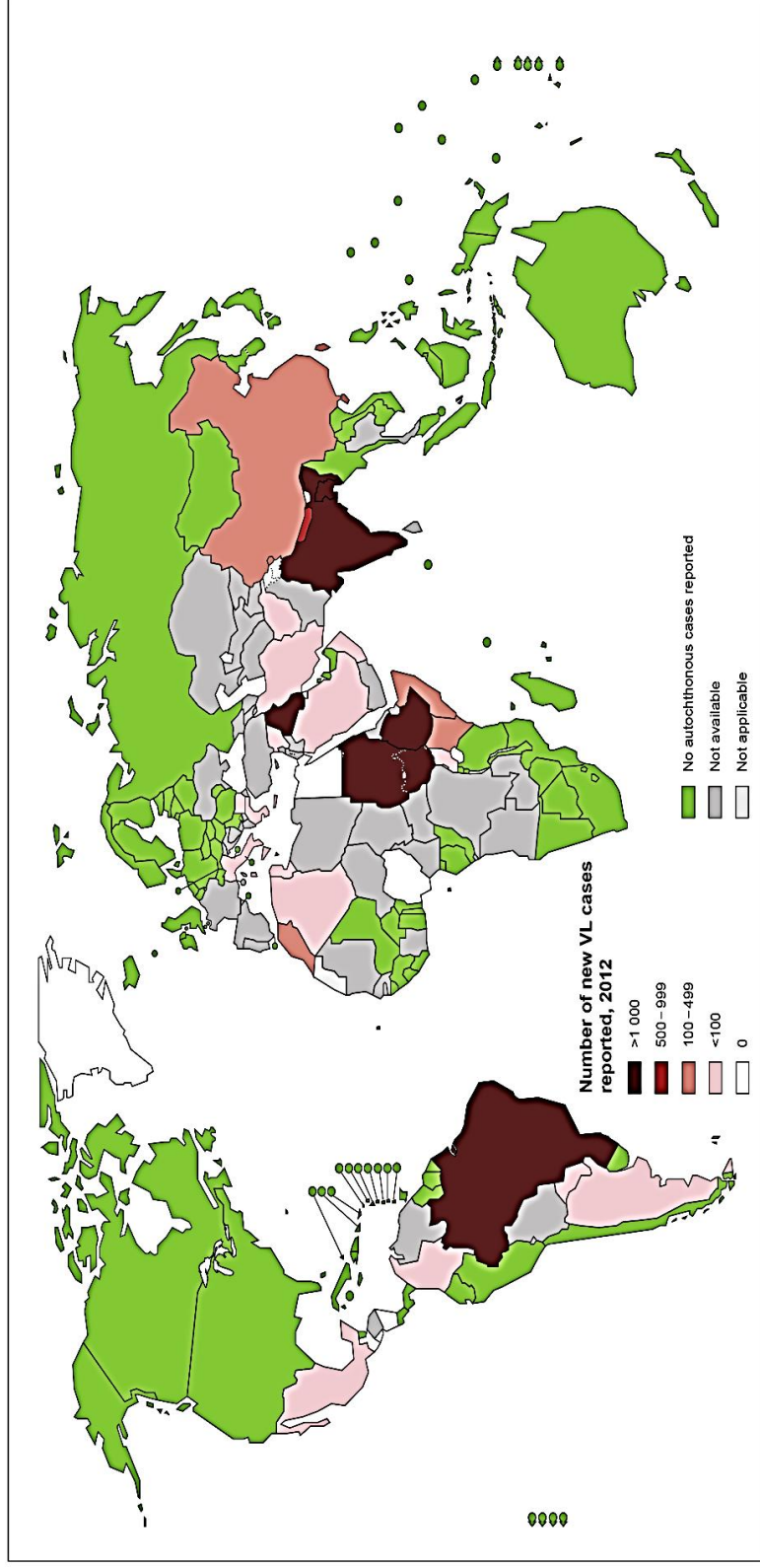
A esta enfermedad se le conoce con diferentes nombres los cuales varían por regiones. En la Costa es nombrada como *charra colombiana*, *charra brava* o *sarna brava*. En la zona Amazónica se nombra *milliaa caracha* o *ulcera brava* cuando se habla de leishmaniasis cutánea, y en el caso de la muco-cutánea se le conoce como lepra de montaña. En los Andes es conocida como *nigua de ratón* o *grano malo*. No obstante, existe una coincidencia entre las tres regiones sobre el nombre del vector que provoca la enfermedad, al cual reconocen como *manta blanca* (Calvopina, 2004; Hashiguchi, 2014).

2.1.2. Distribución geográfica

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en el año 2015 la proliferación de casos de leishmaniasis muco-cutánea y cutánea tuvo un aproximado de 3.058 casos. Asimismo, la existencia de zonas con bosques

subtropicales y tropicales del tipo densa, húmeda, templada y seca conlleva a que aumente drásticamente la cantidad del número de casos señalados, esto debido a que dichas zonas son los nichos ecológicos apropiados para el desarrollo del vector y sus reservorios. En la figura 1, se muestran las zonas endémicas de leishmaniasis cutánea a nivel mundial.

Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2012



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2013. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Figura 1. Mapa de zonas endémicas de leishmaniasis cutánea a nivel mundial
Tomado de: Uribarren, 205

Según informes del Ministerio de Salud Pública, en Ecuador, durante el período 2002-2013, la enfermedad en cuestión se registra en 23 de las 24 provincias existentes, a excepción de Galápagos, según los casos observados, hubo una tasa de 1512 casos anuales y un promedio de incidencia de 9,7 por 100.000 habitantes.

Según la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2015), el mayor número de casos reportados en el país se centran en cuatro provincias: Pichincha, Esmeraldas, Morona Santiago y Orellana.

Teniendo en cuenta esta situación, se decidió realizar la investigación en localidades de la provincia de Pichincha, Sucumbios y Morona Santiago, principalmente por las incidencias de la enfermedad en dichas áreas; además se consideró una localidad de Sucumbíos, ya que en dicha provincia no se han realizados estudios de esta índole, a pesar de ser una zona endémica de *lutzomyia* con características climáticas idóneas para el desarrollo de este flebótomo. de esta manera se puede realizar un estudio mas completo donde se tiene en cuenta la comparación de dos zonas con características diferentes como es el caso de la Sierra y la Amazonía.

2.1.3. Epidemiología

La leishmaniasis es considerada como una problemática de salud pública por la Organización Mundial de la Salud y Organización Panamericana de la Salud en los últimos años, debido a que puede causar incapacidad, mutilaciones y hasta la muerte (Organización Mundial de la Salud, s.f.). “Mundialmente, se estima que existen 200 millones de personas expuestas al riesgo de infección y 300.000 casos anuales de leishmaniasis cutánea” (Guamán, 2013).

Múltiples causas han motivado el creciente interés en su epidemiología, programas de vigilancia y control para el diagnóstico prematuro, un tratamiento adecuado y la disminución de contacto entre el vector y el ser humano en los

países donde se encuentra esta enfermedad de manera endémica (Claborn, 2010).

“Podría estimarse que alrededor de 3000 a 4500 personas pueden contraer la enfermedad cada año en nuestro país y que el riesgo de contraer esta enfermedad es tan alto que de 3.1 hasta 4.5 millones de personas podrían estar en alto riesgo de contraer Leishmaniasis” (Guamán, 2013).

De ahí la importancia que tiene la vigilancia epidemiológica y el desarrollo de acciones preventivas para reducir en mayor medida los riesgos de infección y propagación de la enfermedad.

2.1.3.1 Leishmaniasis cutánea

Es también reconocida como Leishmaniasis tegumentaria americana, es endémica de Ecuador y se encuentra en zonas tropicales y subtropicales, además, también se puede encontrar en los valles interandinos (Calvopiña, et al., 2013).

En su forma clínica este padecimiento afecta las áreas del cuerpo donde el leishmanio tiene acceso a la piel desnuda. “El espectro clínico de la leishmaniasis cutánea es amplio y puede simular el de otras enfermedades cutáneas” (OMS, s.f.). Asimismo, los parásitos asociados a la leishmaniasis cutánea para el continente americano son: *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana*, y para el viejo mundo *Leishmania major* (Claborn, 2010).

La lesión se muestra como una pápula que seguidamente se convertirá en una úlcera que provoca dolor y comezón, esta lesión emerge en el lugar donde se dio la picadura de la mosca. Igualmente, existe otro ejemplar de leishmaniasis cutánea nombrada difusa, en la cual las laceraciones se extienden por toda la

piel asemejándose a la lepra (Claborn, 2010; Organización Mundial de la Salud, s.f.). (Ver Anexo 1)

2.1.3.2 Leishmaniasis muco-cutánea

Esta se halla en zonas tropicales y húmedas con un índice pluvial frecuente, también logran residir en zonas secas (Roqueline et al., 2014; Calvopiña et al., 2013).

También es causada especialmente por la *Leishmania braziliensis* y en ocasiones por la *Leishmania aethiopica*. La leishmaniasis muco-cutánea origina lesiones destructivas y deformantes en las áreas donde se desenvuelven, logra ser tal el daño que puede llegar a causar la muerte de la víctima (Roqueline et al., 2014; Organización Mundial de la Salud, s.f.). (Ver Anexo 2)

“Muchas lesiones permanecen localizadas, pero en algunos casos, los parásitos pueden propagarse a través de los vasos linfáticos y producir lesiones secundarias en la piel o, en ocasiones, en las mucosas, llamándose de tipo mucocutánea; cabe recalcar que en este caso es muy común la afectación de ganglios linfáticos vecinos” (Guamán, 2013).

2.1.3.3 Leishmaniasis visceral

La Leishmaniasis visceral, o también conocida como kala-azar, se presenta en su mayoría en países como: India, Bangladesh, Sudán, Sudán del Sur, Etiopía y Brasil (Uribarren, 2015). “Los agentes etiológicos pertenecen al complejo *L. donovani*. Se estiman unos 400 000 casos nuevos/año, y se considera que 1 de cada 10 pacientes fallece debido a la enfermedad” (Uribarren, 2015).

Existen varias formas en las que se puede manifestar esta infección, dígame: asintomática, aguda o crónica, donde “los niños con algún grado de

desnutrición y los sujetos HIV positivos” (Uribarren, 2015) constituyen los individuos de mayor riesgo de adquisición de la enfermedad. Los tiempos de incubación de la enfermedad son relativos, puesto que varían de meses a años, donde la sintomatología se da generalmente de manera insidiosa, en ciertos casos se manifiesta con un nódulo como única sintomatología de la enfermedad. Por lo general esta enfermedad no presenta cuadros agudos, por lo que cuando es evidente su diagnóstico, ya se considera en estado grave, la mortalidad es segura al cien por ciento sino se aplica un tratamiento adecuado (Uribarren, 2015).

En el caso de la forma visceral de la enfermedad, esta no ha sido demostrada en Ecuador, a pesar de estar presente en países vecinos como Colombia, en un estudio realizado en 235 personas y 35 perros de la Amazonia en Arajuno-Pastaza no se encontró ningún caso (Calvopiña, 2004).

2.2. Flebótomos

2.2.1. Apariencia y comportamiento

Los flebótomos son diminutos insectos de la familia Psychodidae del orden Diptera con una longitud que puede variar de 2 a 3 mm. Su coloración varía entre el blanco a casi negro.

Los flebótomos tienen tres tipologías que lo hacen fácil de conocer entre el resto de los insectos: sus alas crean un ángulo sobre el abdomen cuando se hallan en estado de reposo, su cuerpo está todo cubierto por un fino bello y contrario al resto de otras moscas, su vuelo es breve y discreto con un característico movimiento a manera de salto. Diferentes estudios han confirmado que la distancia de vuelo puede variar entre especies pero muy rara vez se extiende a un kilómetro. Su máxima velocidad en vuelo es un poco menos de 1m/seg (OPS y OMS, s.f.).

El entorno en el que se desarrollan por lo general es entre frío y húmedo, por este motivo, suelen localizarse en casas; establos; letrinas; rocas; cuevas; o en el mismo suelo; igualmente en lugares con una vegetación densa, dentro de guaridas de roedores y otros mamíferos; nidos de pájaro y termitas. Su actividad física es noctámbula o en el crepúsculo vespertino, gracias a ello son muy pocas las especies que logran picar durante el día.

Tan solo los flebótomos hembras se sustentan de sangre para engendrar sus huevos, sus picaduras son bien dolorosas, casi en su totalidad son exofágicas, es decir, pican al aire libre, pero también existen especies exofílicas que son aquellas que reposan al aire libre durante las etapas de maduración de huevos. Además, existen especies endofílicas que reposan en el nido durante la gestación de huevos (Killick-Kendrick, 1999; Maroli et al., 2013).

Actualmente se reconocen cerca de 800 especies de flebótomos, distribuidas en cinco géneros importantes; tenemos *Phlebotomus* (94 especies) en el viejo mundo y *Sergentomyia* (258 especies) y las Américas *Lutzomyia* (379 especies), *Bruptomyia* (23 especies) y *Warileya* (5 especies) de estos, los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* han sido tratados como vectores de *Leishmania* (Young, et al, 1994, Anaguano, 2014).

Por otro lado, Guamán realiza la siguiente descripción respecto al desarrollo morfológico del parásito que provoca la enfermedad de Leishmamyia sp.p:

“El parásito causante de la Leishmaniasis presenta dos estados morfológicos, siendo su primer estado el promastigote, presente de forma extracelular y ubicada en el intestino del vector, el cual es inoculado dentro de los hospedadores, entre ellos el hombre. Una vez inoculado por la picadura del mosquito vector, estos promastigotes se transforman en su segundo estado morfológico, conocido como amastigote, siendo esta forma parasitaria la que es observada en los frotis para realizar el diagnóstico de la

enfermedad, y la que se encuentra de manera intra-lesional en los bordes de las úlceras de los pacientes infectados. Luego de un periodo que oscila entre 2 semanas a 2 meses (incubación), se inician las manifestaciones clínicas en la piel” (Guamán, 2013).

2.2.2. Distribución del vector

Las moscas de arena se hallan repartidas fundamentalmente en las regiones con un clima cálido en todo el mundo, incluyendo el sur de Europa, África, Asia, Australia, América del Sur y América Central, exceptuando las islas de Pacífico y Nueva Zelanda (Killick-Kendrick, 1999; Maroli et al., 2013; Ready, 2013). Referente a la altitud donde pueden encontrarse, estudios han manifestado la capacidad de este vector de acuerdo con su presencia en un amplio rango de elevación, que va desde 5 a 3300 metros sobre el nivel del mar (Anaguano et al., 2015; Maroli et al., 2013).

2.2.3. Biología del vector

En contradicción con los mosquitos culícidos, los flebótomos en sus fases inmaduras no requieren de agua para cumplir su desarrollo, aunque precisan de hábitats cálidos y húmedos. Los flebótomos presentan una metamorfosis completa, la cual se fracciona en cuatro fases: huevo, larva (cuatro estadios), pupa y adulto. Las hembras adultas realizan la ovoposición y lo hacen en lugares con abundante materia orgánica, pues esta provee de resguardo, humedad y sustentación a las larvas recién surgidas.

Los huevos miden un aproximado de 0.3-0.5 mm de longitud, tienen en sus comienzos una coloración blanca o gris claro, aunque tienden a tomar una coloración marrón oscuro o negro posteriormente a la ovoposición.

Las hembras necesitan de sangre para terminar la producción del lote de huevos. Su nacimiento es variable de acuerdo a la temperatura y el progreso

de las larvas es normalmente lento. Al mismo tiempo, solo unas pocas especies de flebótomos son aptos para producir huevos viables sin necesitar extraer sangre (Killick-Kendrick, 1999; Maroli et al., 2013; Ready, 2013).

2.2.5 Fuentes de alimentación de los flebótomos

La determinación de los vertebrados que actúan como reservorios de *Leishmania* es muy importante para tener una mejor visión y referencia del ciclo epidemiológico de la leishmaniasis y aporta información trascendental a la hora de tomar medidas de control sobre la enfermedad (Ashford, 1996).

Mediante la identificación de los animales que constituyen las fuentes de alimentación de las especies de vectores hembras, es una manera efectiva de determinar cuáles serían los potenciales reservorios de la leishmaniasis (Haouas et al. 2007).

En el continente americano se ha empleado la observación directa como medio fundamental para la determinación de las fuentes alimenticias, donde se emplean trampas con diferentes animales y se evalúa la atracción de las distintas especies flebotomías hacia dichos animales de prueba, seguido del análisis del patrón de cristalización de la hemoglobina animal contenida en el tracto digestivo del individuo y mediante el empleo de ensayos de Precipitina o ELISA para el análisis serológico de la sangre obtenida del flebótomo analizado (Tesh et al. 1971, Tesh et al. 1972, Morrison et al. 1993, CIDEIM 1994, Cochero 2002, Nery et al 2004, Marassa et al. 2004, Marassa et al. 2006, Oliveira et al. 2008).

Gracias a los ensayos serológicos se han podido reducir el número de potenciales especies que actúan como reservorios de la enfermedad, y a su vez, constituye una fuente importante de información respecto a las preferencias alimentarias de los flebótomos en su ambiente natural (Tesh et al. 1971, Tesh et al. 1972, Nery et al. 2004, Marassa et al. 2004).

No obstante, a pesar de la utilidad de las técnicas mencionadas sobre la necesidad de comprender la epidemiología de la leishmaniasis, es importante referir las dificultades que estas representan debido a la alta diversidad de potenciales reservorios y a la carencia de sus respectivos antisueros, también como dificultades se debe contemplar el proceso digestivo de los flebótomos que inciden y afectan la estructura primaria y tridimensional de los antígenos a detectar con una consecuente pérdida de especificidad y/o sensibilidad, y periodo de tiempo demasiado corto para la de detección una vez que ha ocurrido la ingesta sanguínea, tiempo que no excede las 24 horas (Marassa et al. 2004, Haouas et al. 2007).

Actualmente se emplean técnicas de biología molecular como una opción sensible y reproducible que posibilita superar dichas dificultades técnicas (Chow-Shaffer et al. 2000, Ngo and Kramer 2003, Kent and Norris 2005, Meece et al. 2005, Oshaghi et al. 2006, Haouas et al. 2007, Abbasi et al. 2009).

El gen citocromo b (Mt-Cyb) constituye el estándar para la identificación de fuentes alimentarias puesto que es de origen mitocondrial y permite alcanzar miles de copias por células (Berry et al. 2000, Svobodová et al. 2009), no obstante, con el empleo de este gen se puede co-amplificar secuencias del insecto vector lo que ha hecho necesaria la búsqueda de marcadores genéticos exclusivos de vertebrados que puedan ser utilizados para el mismo fin.

Desde hace poco tiempo, se ha propuesto el gen nuclear de copia única PNOC, como candidato para reemplazar a futuro el gen Mt-Cyb (Haouas et al. 2007), “este gen es característico de vertebrados y codifica el precursor proteico de la Nociceptina/Orfanina FQ, un péptido asociado a la diferenciación celular neuronal y vías de dolor” (Mollereau et al. 1996, Zaveri et al. 2000, Zaveri et al. 2002, Zaveri et al. 2006).

Capítulo III. Metodología

3.1 Instituciones participantes

El trabajo que se titula: DETECCIÓN MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES DE HOSPEDEROS ALIMENTICIOS DE LUTZOMYIA E INFECCIÓN NATURAL CON LEISHMANIA *sp.* EN LAS PROVINCIAS DE MORONA SANTIAGO, PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, fue elaborado en los laboratorios del Centro de Investigación Traslacional (CIT) de la Universidad de las Américas en cooperación con el área de Entomología del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI). Esta investigación se adjunta al proyecto “Sistema nacional de vigilancia y alerta temprana para el control de los vectores de Malaria y Leishmaniasis”, proyecto que se realiza con el fomento de la SENESCYT y la UDLA. Gran parte de esta investigación ha sido de inspiración para el proyecto de pregrado antes de la obtención del grado de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Américas-UDLA.

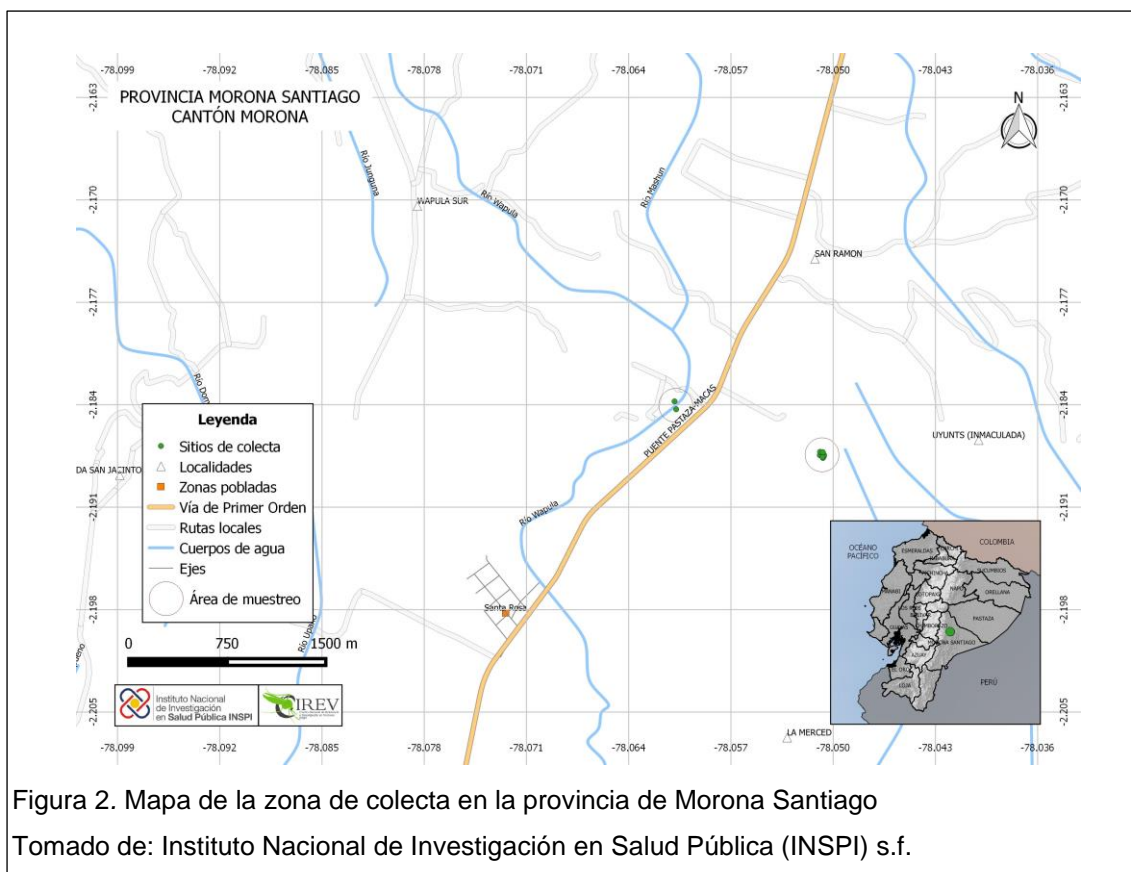
3.2 Procedimientos

3.2.1 Áreas de estudio

Esta investigación se efectuó en tres localidades de las provincias de Morona Santiago, Pichincha y Sucumbíos.

La primera colecta se realizó en la provincia de Morona Santiago, donde previamente se efectuó un estudio en la localidad de Macas. Según la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2015), en el cual se encontraron alrededor de 99 casos de leishmaniasis durante el año 2015. Geográficamente, la parroquia de Macas se encuentra ubicada a 2,18381° latitud sur, 78,06093° de longitud oriental y a una altura de aproximada de 1176 metros por encima del nivel del mar (Figura 2). Macas es una región donde la temperatura media es de aproximadamente

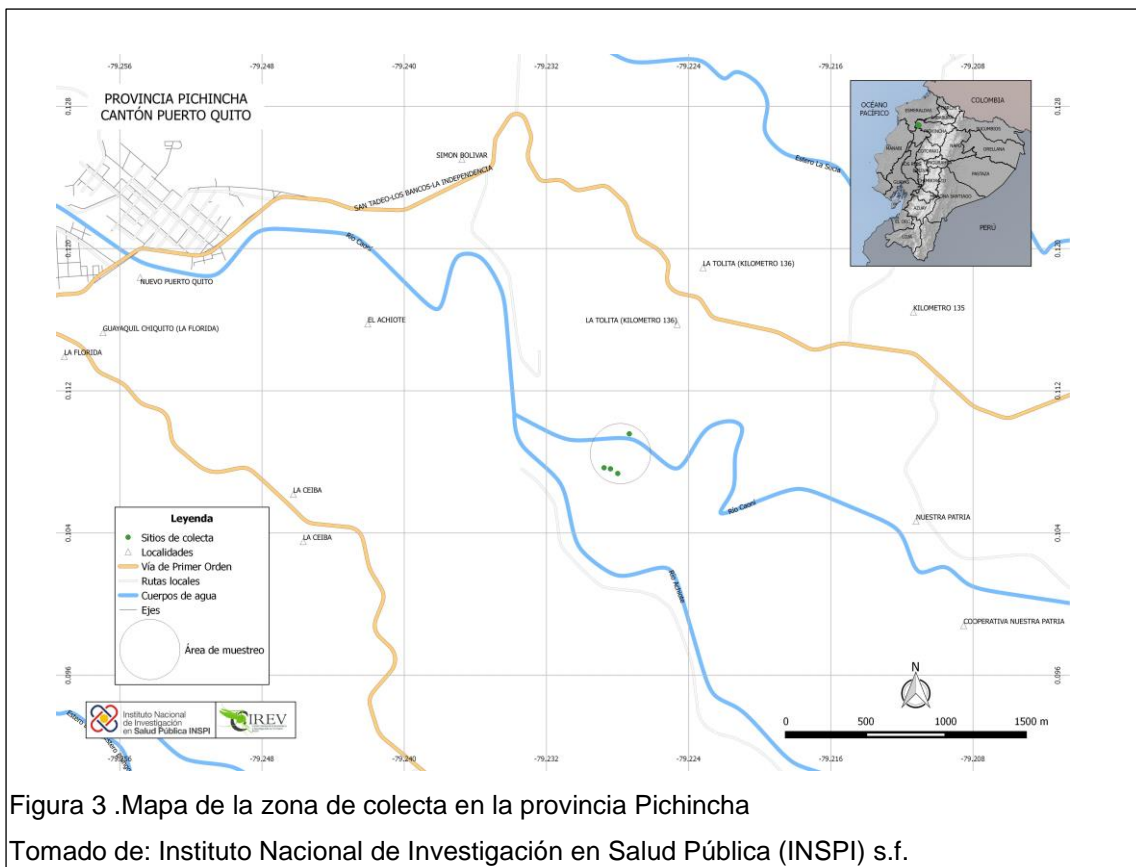
20°C, cuyo clima se caracteriza por ser cálido – húmedo, con abundantes precipitaciones anuales de 2000 mm aproximadamente, lo que posibilita que las temperaturas se mantengan elevadas prácticamente todo el año (Palacios y Ontaneda, 2013).



La segunda colecta fue realizada en la localidad de Puerto Quito, ubicada al noroccidente de la provincia de Pichincha. Según la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2015), se encontraron alrededor 332 casos de leishmaniasis durante el 2015. Geográficamente, se encuentra ubicada en 0,10792° de latitud norte, 79,23088° de longitud oriental y con una altura de 135 msnm aproximadamente (Figura 3).

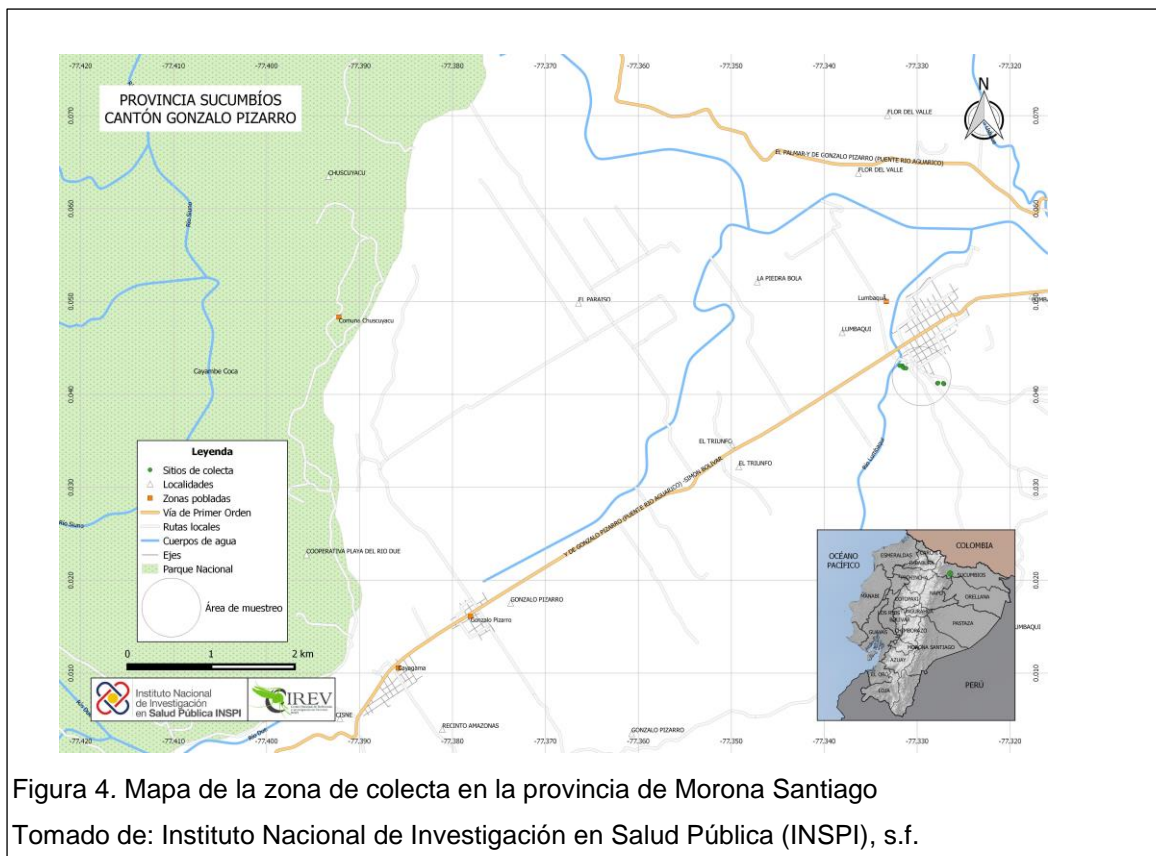
Esta zona es considerada lluviosa- tropical, cuyas temperaturas oscilan entre los 18 y 33°C en verano, llegando a alcanzar los 38°C, donde las temperaturas medias anuales son de aproximadamente 25.5°C y una humedad relativa del

67%. Las precipitaciones anuales son de aproximadamente 190-690 mm (Palacios y Ontaneda, 2013).



La tercera y última colecta se realizaron en la localidad de Lumbaquí, ubicada en la cabecera cantonal del cantón Gonzalo Pizarro, provincia de Sucumbíos al noreste de Ecuador, correspondiente a la región amazónica. Según la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2015), se encontraron alrededor 62 casos de leishmaniasis durante el 2015. Geográficamente, se encuentra ubicada en los 0.04309° de latitud norte y 77,33164° longitud oriental, a una altura de 520 msnm aproximadamente (Figura 4). Esta zona, en la medida en que se adentra en la región amazónica, varía en cuanto a su temperatura, vientos y humedad, es considerada una zona de clima tropical húmedo con altas temperaturas, donde las temperaturas medias anuales son de aproximadamente 28°C y una

humedad relativa del 90%. Las precipitaciones medias anuales son de aproximadamente 3500-4800 mm (Palacios y Ontaneda, 2013).



3.2.2 Recolecta de flebótomos en campo

Para la recolección de especímenes de flebótomos se utilizaron dispositivos de trampas de luz normal tipo CDC (BioQuip Products, USA) (Figura 5), las mismas se utilizan en capturas nocturnas y funcionan atrayendo a las lutzomias mediante la luz y estas a su vez son absorbidas por un flujo de aire creado por la hélice (Córdova, *et al*, 2011; Desjeux, P, 2004).



Figura 5. Trampas de CDC de luz normal empleadas para la colecta de flebótomos en campo.

El empleo de estas trampas en cada sitio de trabajo se apoyó en la guía de transecto lineal. En este modelo, se suprimen las elevaciones del suelo, tomado un cotejo como si se localizara todo a una misma altura, asentando todo espécimen que llega a la línea del transecto. Para esta labor, se requiere la ubicación estricta del sitio de estudio en un mapa, seguido de datos ambientales del área (Anaguano *et al.*, 2015). Las trampas fueron situadas en seis puntos del sitio de estudio a una distancia de 150 m entre cada una de ellas, comenzando por el punto más próximo al sitio domiciliar, luego en el peri domiciliar y el último punto se ubicó en bosques.

Las capturas se efectuaron en dos viajes de campo en dos épocas del año (seca-lluviosa). La primera colecta se efectuó en las dos localidades en los meses de septiembre y octubre, los cuales corresponden a la temporada seca. El segundo período de captura fue en los meses de marzo y abril, época de lluvias. Las colectas se ejecutaron durante tres noches seguidas y la instalación de las trampas se realizó desde las 18h00 hasta las 06h00 del día siguiente (Figura 6).

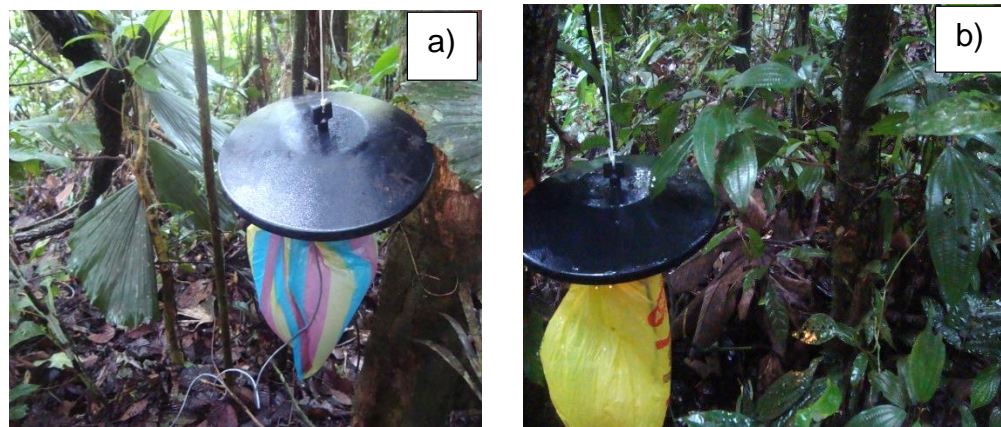


Figura 6. *Colecta de flebótomos*

- a) Colecta de flebótomos durante la temporada seca
- b) Colecta de flebótomos durante la temporada lluviosa

Las trampas se colocaron a una altura máxima que no sobrepasó el 1 m en todas zonas, en la zona domiciliar se colocaron justo detrás de las estructuras de las casas de campo a aproximadamente unos 150-300 metros de estas (Figura 7), en la zonas peri-domiciliares las trampas fueron ubicadas a partir de los 300 hasta los 450 metros alejados de las casas, donde generalmente se encuentran los corrales de animales domésticos, ganaderos y los cultivos, que por lo general se trataban de cultivos de café o cacao (Figura 8); y en último caso se tienen las trampas ubicadas en el bosque, donde se consideró una lejanía de 450-600 metros aproximadamente de las casas, en lugares propicios para la captura, donde se tuvo en cuenta que fuese de follaje cerrado para evitar el traspaso de luz y a su vez, con hábitats propicios para la presencia de flebótomos. También se consideraron, guaridas de animales silvestres y riveras de ríos (Figura 9).



Figura 7. Ubicación de trampas en zona domiciliar

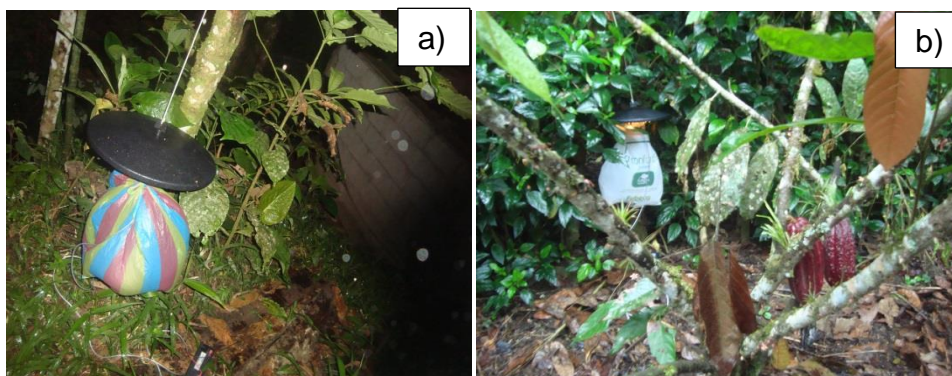


Figura 8. Ubicación de trampas en la zona peri-domiciliar.

- a) Cerca de corrales
- b) En cultivo de café y cacao.



Figura 9. Ubicación de trampas en la zona de bosque.

- a) Rivera de río y
- b) Madriguera de animal silvestre.

3.2.3 Procesamiento, montaje e identificación taxonómica de flebótomos

Todos los insectos coleccionados en el campo fueron mantenidos vivos en la red de la trampa, posteriormente se sacrificaron exponiéndolos a 4°C durante una hora, luego los individuos se colocaron en cajas Petri de plástico para ser trasladados y procesados en el laboratorio manteniéndolos a 4°C para su conservación. Posteriormente, se separaron los flebótomos del resto de individuos colectados, y luego se clasificaron por día, trampa y época de colecta, para lo cual se empleó un estereoscopio Discovery VI2 (ZEISS, Alemania). Los individuos identificados como *Lutzomyias*, se separaron en machos y hembras, a su vez, las hembras se separaron en hembras sin y con ingesta sanguínea (Figura 5).

Para el procesamiento general se realizó la individualización empleando microtubos de PCR, lo que permitió la manipulación de los individuos y evitó la contaminación de unos con otros.

Una vez identificados los géneros de flebótomos, se seleccionaron los que presentaron ingesta para seccionar la cabeza del tórax, las alas y los tres últimos segmentos del abdomen, con el propósito de enviar la parte central del abdomen al área molecular y el resto, dígame, alas, cabeza, y últimos segmentos del abdomen son enviados a el área central del laboratorio para su identificación taxonómica. Fueron almacenados a -20°C el resto del abdomen junto con el tórax y las alas en micro tubos individuales y etiquetados para su posterior extracción de ADN.

La cabeza, el ala y los segmentos finales del abdomen de los especímenes con ingesta sanguínea, se clarificaron de manera química con hidróxido de potasio al 10% por 8 horas para poder observar las estructuras internas esclerotizadas necesarias para la identificación taxonómica. Las partes clarificadas se colocaron en medios semipermanentes y permanentes, que variaron desde Goma Arábica, Euparal y Bálsamo de Canadá acorde con el presupuesto que

se disponía al momento del estudio, para microscopia (Merck®) sobre un porta objetos, con cada parte sumergida previamente en alcohol al 70%. Una vez seco, mediante un microscopio Axio Scope.A1 (ZEISS, Alemania) se identificaron los especímenes según la clave taxonómica de Young y Duncan (Young, D.G. y Duncan, M.A., 1994) en base a las similitudes del cibario, palpos, alas y espermatecas del flebótomo, documentadas en fotografías de las especies identificadas (Figura 10).

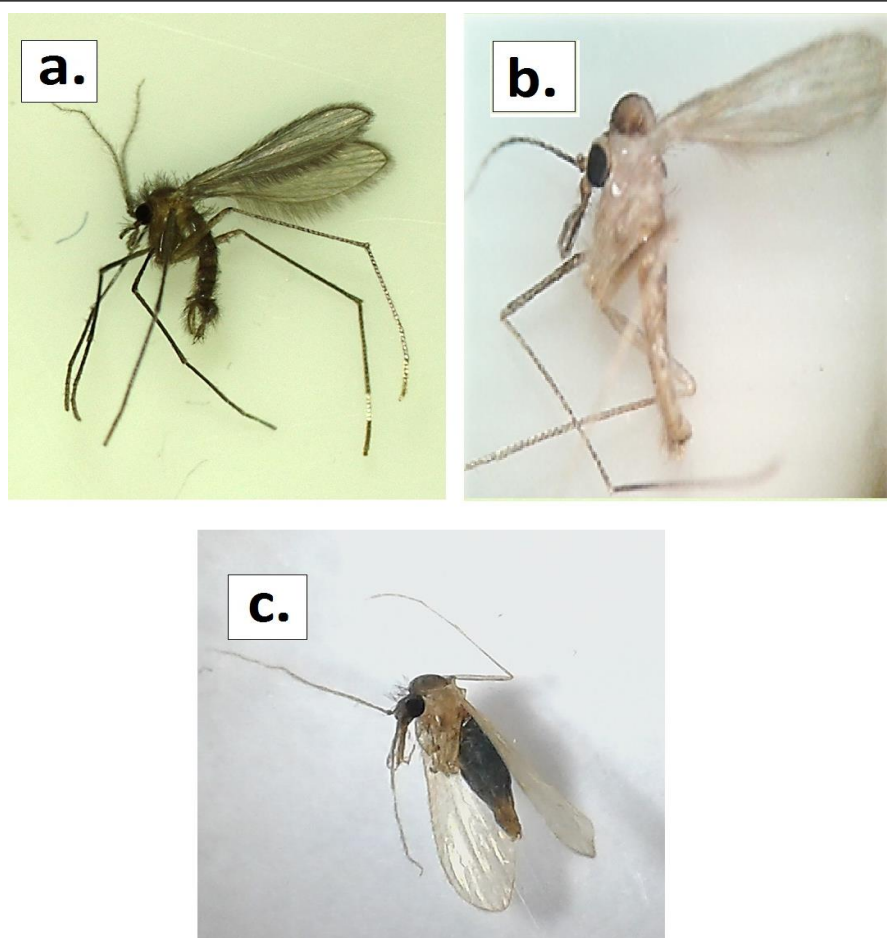


Figura 10. Clasificación de los flebotomos por su condición y sexo para su posterior disección y montaje:

- a) Macho (25X),
- b) Hembra sin ingesta (15X) y
- c) Hembra con ingesta (30X)).

3.2.4 Extracción de ADN total

A nivel molecular se analizaron e investigaron genes de fuentes alimenticias para los flebótomos, específicamente un gen de la familia Trypanosomatidae, que encierra a los géneros *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Endotrypanum*.

A partir de los abdómenes de las hembras alimentadas individualizadas se realizó la extracción de ADN usando el kit DNeasy Blood® & Tissue (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante:

- Se conservaron e individualizaron en micro tubos esterilizados de 0.5 mL y señalados con su respectiva información de colecta.
- Se colocaron 60 µL de Buffer ATL en un tubo de 1,5ml junto con el abdomen, se cortó utilizando una tijera de micro disección de acero quirúrgico para obtener fragmentos imperceptibles.
- Se añadieron 20 µL de Proteinasa K, y se puso a incubar a 56°C durante toda la noche, sin sobrepasar las 15 horas.
- Se colocaron en el vórtex durante 15 segundos, se añadió 200 µL de buffer AL y nuevamente se mezcló mediante el vórtex.
- Se agregaron 200 µL de etanol a una concentración del 100% y se mezcló en el vórtex.
- Se ubicaron el lisado en un tubo colector de 2 mL y se procedió a centrifugar a 8000 rpm durante un minuto, se eliminó la cantidad filtrada.
- Se aplicaron 500 µL de buffer AW1 y se centrifugó durante un minuto a 8000 rpm, y seguido se eliminó la cantidad filtrada.
- Luego, se agregaron 500 µL de buffer AW2 y se centrifugó durante tres minutos a 14000 rpm, y luego se eliminó la cantidad filtrada.
- Por último, se colocaron al tubo colector dentro de un tubo de 1.5 mL, a este, se agregó 100 µL de buffer de elución AE, dejando incubar a temperatura ambiente durante un minuto y se procedió a centrifugar por un minuto a 8000 rpm para su elución.

Todas las muestras procesadas se cuantificaron, a partir del ADN obtenido se midió la absorbancia (260/280) y su cantidad (ng) por medio de espectrofotometría utilizando el equipo Synergy HT (BioTek Instruments, USA). Para conservar las muestras, se llevó a todos los tubos de 1,5ml a una temperatura de -20°C hasta el uso en las amplificaciones posteriores.

3.2.5 Amplificación de ADN de ingestas alimentarias

La amplificación del ADN de muestras procesadas fue realizada en un termociclador Mastercycler Pro (Eppendorf, Alemania). En todas las pruebas se uso ADN polimerasa Platinum *Taq* (Invitrogen, Life Technologies, USA). Los primers fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies en Estados Unidos.

3.2.5.1 Amplificación de ADN mitocondrial de vertebrados

El conjunto de primers utilizado para la amplificación de ADN mitocondrial de vertebrados fue L14841 (forward, 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') y H15149 (reverse, 5'-CCCCTCA GAATGATATTTGTCCTCA-3'). Durante la amplificación se tomó un fragmento de 358 bp del gen mitocondrial citocromo B específico para vertebrados (Lah et al., 2012; Maleki-Ravasan et al., 2009; Oshaghi et al., 2005). Se llevó a cabo la PCR en las condiciones de reacción y programa de termociclado detalladas en la Tabla 1.

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

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

Para el control positivo se procedió a extraer ADN total mediante DNeasy Blood® & Tissue (Qiagen) a partir de una muestra de sangre humana. Se usó agua destilada libre de nucleasas como control negativo, descartando una contaminación exterior en el proceso de manipulación y preparación de cada reacción.

3.2.5.2 Amplificación de ADN nuclear de mamíferos

Por otra parte, se amplificó una fracción de 330 bp del gen nuclear que codifica la Prepronocicpetina (PNOC), el cual es específico para mamíferos. Se utilizó un par de primers PNOC-F (forward, 5'-GCATCCTTGAGTGTGAAGAGAA-3') y PNOC-R (reverse, 5'-TGCCTCATAACTCACTGAACC-3')(Haouas et al., 2007). Se llevó a cabo la PCR en las condiciones de reacción y programa de termociclado detalladas en la Tabla 2.

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

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

Para el control positivo se procedió a extraer ADN total mediante DNeasy Blood® & Tissue (Qiagen) a partir de una muestra de sangre humana. Se usó agua destilada libre de nucleasas como control negativo, descartando una contaminación exterior en el proceso de manipulación y preparación de cada reacción.

3.2.5.3 Amplificación de ADN mitocondrial de mamíferos domésticos

El sistema de PCR multiplex se realizó en las condiciones de reacción y termociclado mostrados en la Tabla 4. Los fragmentos amplificados corresponden al gen mitocondrial citocromo B de cuatro mamíferos domésticos: vaca, perro, cerdo, chivo que poseen diferentes tamaños de fragmento específico y humano (Kent y Norris, 2005). Las secuencias de los primers en dirección 5'-3' fue específica para los hospederos y se indican en la Tabla 3.

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

Hospedero	Primer	Secuencia (5'-3')	Fragmento (bp)
<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
	UNREV1025	GGTTGTCCTCCAATTCATGTTA	-

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

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

Para el control positivo se hizo extracción de ADN total mediante el kit DNeasy Blood® & Tissue (Qiagen) a partir de muestras de sangre de cabra, vaca, humano, cerdo y perro. Se usó agua destilada libre de nucleasas como control

negativo, descartando una contaminación exterior en el proceso de manipulación y preparación de cada reacción.

3.2.5.4 Amplificación de ADN mitocondrial de Galliforme

Se amplificó un fragmento del gen mitocondrial de citocromo B específico para el orden Galliformes con un fragmento de amplificación de 210bp (Chang et al. 2008; Garcia-Rejon et al., 2010; Ngo, K.A. y Kramer, L.D., 2003). Se utilizó un par de primers que fueron GallF (forward, 5'-ATTTCTGGCTCCCTATTAGCAG-3') y GallR (reverse, 5'-GTCCGAT GTGAAGGAAGATACAGATGAAGAAGAA-3'). Se llevó a cabo la PCR en las condiciones de reacción y programa de termociclado detalladas en la tabla 5.

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

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

El control positivo fue ADN total extraído mediante el DNeasy Blood® & Tissue (Qiagen) de una muestra de sangre de gallina. Se usó agua destilada libre de nucleasas como control negativo, descartando una contaminación exterior en el proceso de manipulación y preparación de cada reacción.

3.2.5.5 Amplificación de ADN de *Leishmania* spp.

Para detectar infecciones naturales con *Leishmania* spp. se utilizaran primers específicos para la familia Trypanosomatidae, incluyendo géneros de

importancia médica como *Leishmania* y *Trypanosoma*; y el género *Endotrypanum*, genéticamente muy relacionado a *Leishmania*.

3.2.5.6 Espaciador Transcrito Interno Ribosomal (ITS)

Con la finalidad de obtener un sistema de PCR específico para la detección de *Leishmania* se pretende usar primers para la amplificación de la región ITS que puede variar entre 300 a 350 pb dependiendo de la especie. Este sistema permite, además, por medio de la digestión enzimática determinar especies de *Leishmania*. El conjunto de primers utilizados fueron L5.8S (forward 5' TGATACCACTTATCGCACTT) y LITSR (reverse 5' CTGGATCATTTTCCGATG). Para los diferentes ensayos en el experimento de PCR se incluyó ADN purificado a partir de promastigotes de cultivo de *Leishmania mexicana* M379 que fue donada por Cayetano Heredia (Lima, Perú) en las instalaciones del Centro de Investigación Traslacional de la UDLA., amplificándose efectivamente lo que permitió utilizarse como control positivo. Las muestras se purificaron usando una PCR Qiagen kit de purificación (QIAGEN). Se usó agua destilada libre de nucleasas como control negativo, descartando una contaminación exterior en el proceso de manipulación y preparación de cada reacción Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de PCR para la región ITS1 de *Leishmania* spp.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓ	PERFIL TÉRMICO	
Buffer	1x	Desnaturalización inicial	95°C x 4 min.
MgCl ₂	2,5 mM	35 ciclos	
Primers (c/u)	0,4 µM	Desnaturalización	95°C x 1 min.
dNTPs	0,4 mM	Alineamiento de primers	53°C x 30 s.
Taq polimerasa	2,5 u/rxn	Extensión	72°C x 60 s.
DNA molde	25 ng/Rx		
Volumen final	25 µL	Extensión final	72°C x 10 min.

3.2.6 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Para la determinación y visualización de los resultados respecto a los procedimientos aplicados anteriormente mencionados, se aplica este paso metodológico, donde los productos de amplificación se analizaron mediante

electroforesis en gel de agarosa. El gel fue teñido con colorante SYBR® Safe Nucleic Acid Gel Stain. Los productos se cargaron en el gel mezclando 8 µL de producto de PCR con 2µL de BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X). Finalmente, se corrió la electroforesis en buffer TBE 0.5X a 80 voltios durante 45 minutos. La fotografía para su documentación se realizó bajo luz ultravioleta en el sistema de documentación Enduro GDS (Labnet International, USA).

Capítulo IV. Resultados

4.1 Composición taxonómica de los flebótomos con ingesta sanguínea

Se colectaron un total de 1745 flebótomos en las localidades de Lumbaquí, Puerto Quito y Macas, de los cuales 987 fueron hembras (56.6%) y 758 (43.4%) fueron machos. Del total de hembras colectadas ($n=987$), el 85.2% fueron hembras sin ingesta y 4.8% hembras alimentadas, las que fueron seleccionadas, para su posterior identificación morfológica y análisis molecular. En la localidad de Macas, en época seca se colectó un total de 179 hembras, 88.8% fueron hembras sin ingesta y 11.2% hembras con ingesta. En la época lluviosa se colectaron 319 hembras, de las cuales 86.5% fueron hembras sin ingesta y el 13.5% de hembras con ingesta.

En Lumbaquí, se colectaron un total de 135 hembras en la época seca, 88.2% ($n=119$) eran hembras sin ingesta y 80.9% ($n=16$) hembras con ingesta. En la época lluviosa se colectó un total de 173 hembras, de las cuales 80.9% ($n=140$) eran hembras sin ingesta y 19.1% ($n=33$) de hembras con ingesta.

Por otro lado, en la localidad de Puerto Quito, se colectó un total de 104 hembras en la época seca, 75% ($n=78$) eran hembras sin ingesta y 25% ($n=26$) hembras con ingesta. En la época lluviosa se colectó un total de 77 hembras, de las cuales el 89.6% ($n=69$) eran hembras sin ingesta y el 10.4% ($n=8$) fueron hembras con ingesta.

Al analizar la distribución espacio-temporal de las hembras alimentadas y sin alimentar en las zonas de colecta, se pudo comprobar que el mayor registro de abundancia total de individuos con y sin ingesta, se obtuvo en la zona de bosque, seguido de las áreas peridomiciliares y finalmente las áreas domiciliarias. Sin embargo al observar el patrón de cada localidad, estas varían (Figura 11).

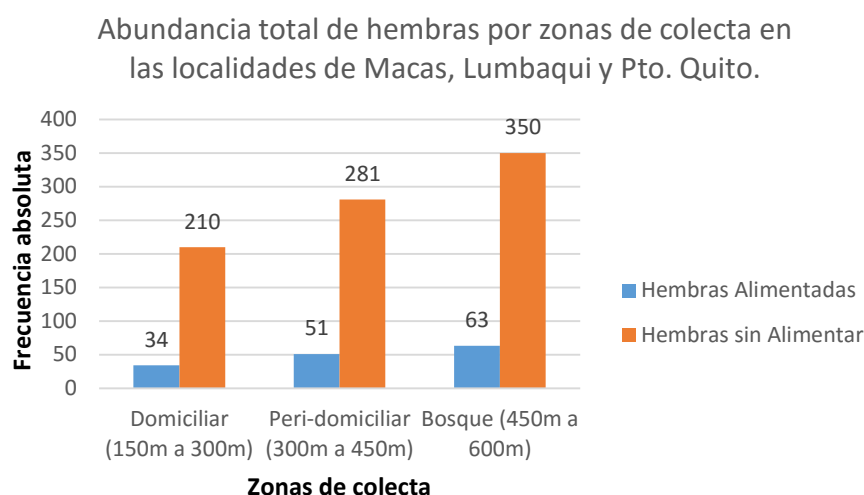


Figura 11. Distribución de la abundancia total de hembras por zonas de colecta en las localidades de Macas, Lumbaqui y Pto. Quito.

El patrón de distribución total también se presenta en la localidad de Lumbaqui-Sucumbíos, donde el mayor porcentaje de hembras alimentadas (57%), fueron colectadas en la zona de bosque, cifras que van disminuyendo en la medida que la colecta se acercaba al área domiciliar, un 31% fueron colectadas en la zona peri-domiciliar y solamente un 12% en la zona domiciliar. En Macas-Morona Santiago, la mayor concentración de hembras con ingesta fue colectada en la zona de bosques en un 41%, seguido de la zona domiciliar con un 30%, y 29% en la zona peri-domiciliar. A diferencia de la localidad de Puerto Quito-Pichincha, donde la zona de mayor colecta de hembras con ingesta fue en la zona peri-domiciliar con un 50%, seguido de la zona domiciliar con un 26% y en último lugar la zona de bosque con un 24%, esto fue similar en las dos temporadas (Tabla 7).

Tabla 7. Incidencia de hembras flebótomas con ingesta por zona de colecta en las localidades de Lumbaquí, Pto. Quito y Macas.

Localidades	Area Domiciliar (150m a 300m)	Area Peri-domiciliar (300m a 450m)	Area de Bosque (450m a 600m)	TOTAL
Sucumbíos - Lumbaquí	6	16	29	51
% de Distribución	12%	31%	57%	100%
Pichincha - Puerto Quito	9	17	8	34
% de Distribución	26%	50%	24%	100%
Morona Santiago - Macas	19	18	26	63
% de Distribución	30%	29%	41%	100%
TOTALES	34	51	63	148
% de Distribución	23%	34%	43%	100%

De acuerdo a la observación de las estructuras internas del cibario (cabeza) y de las espermatecas (tres últimos segmentos del abdomen). En el Anexo 3 y 4 se visualiza las estructuras observadas para la determinación taxonómica de las especies identificadas, cibario y espermatecas respectivamente.

De acuerdo a la clave taxonómica de Young y Duncan (1994), la mayoría de los especímenes fueron identificados hasta el nivel de especie, pocos individuos no pudieron identificarse debido a la pérdida o destrucción de la cabeza y/o abdomen durante el manejo. Se identificaron un total de 148 individuos, que incluyen seis especies y 15 sub-especies en las tres localidades, tanto en la temporada seca como lluviosa. En la Tabla 8 constan las especies identificadas y su abundancia total y en la Fig. 12 se puede observar la abundancia relativa de cada especie.

Tabla 8. Especies identificadas de flebótomos y abundancia total, colectadas en las localidades de Macas, Lumbaqui y Pto. Quito.

ESPECIES	ABUNDANCIA
Nyssomyia yuilli yuilli	22
Nyssomyia yuilli	7
Nyssomyia	6
Psychodopygus carrerai carrerai	8
Psychodopygus carrerai	3
Psychodopygus davisii	8
Psychodopygus sp..	2
Psychodopygus panamensis	7
Micropygomyia trinidadensis	3
Lutzomyia tortura	16
Lutzomyia paraensis	4
Lutzomyia sp..	23
Pressatia sp..	28
Pressatia camposi	2
Trichophoromyia ubiquitalis	9
TOTAL	148

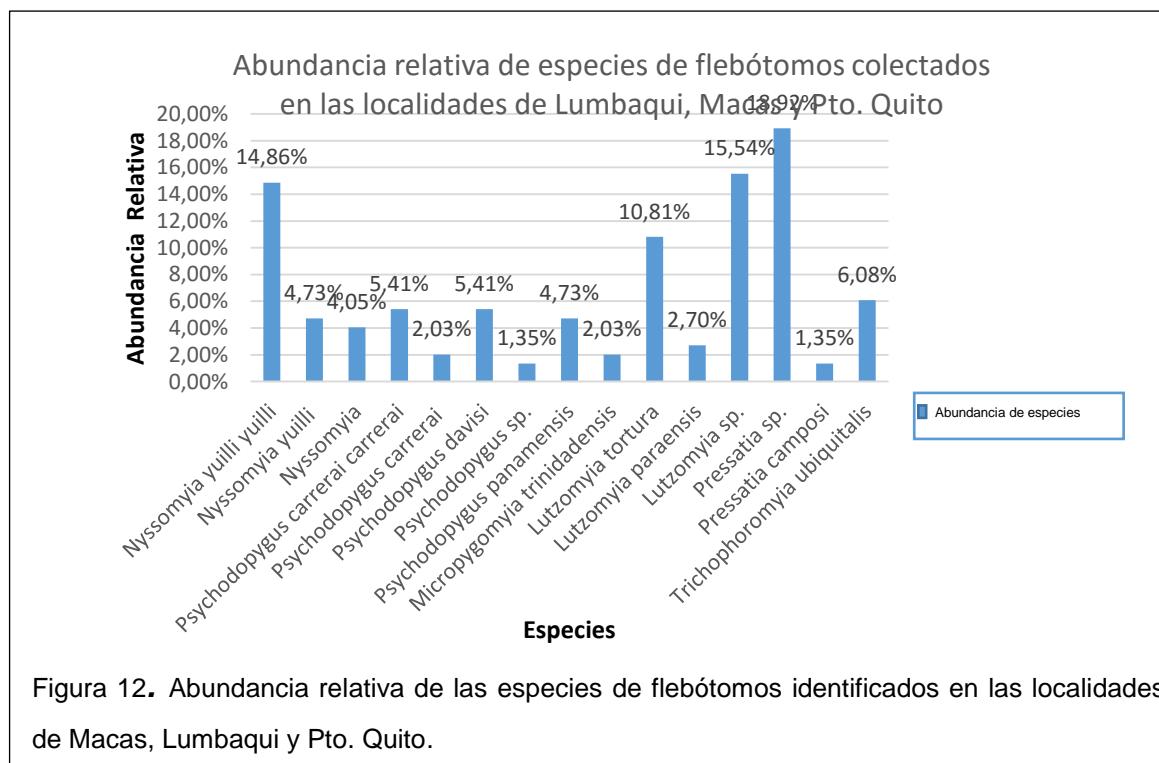


Figura 12. Abundancia relativa de las especies de flebótomos identificados en las localidades de Macas, Lumbaqui y Pto. Quito.

Como se observa en el grafico anterior, las especies con mayor abundancia relativa fueron: *Pressatia* sp. (18.9%), *Lutzomyia* sp. (15.5%), *Nyssomyia yuilli yuilli* (14.9%) y *Lutzomyia tortura* (10.8%).

A continuación en la tabla 9 se presentan los registros de frecuencias absolutas y relativas de las especies de flebótomos identificadas en cada temporada en la localidad de Lumbaquí, provincia Sucumbíos.

Tabla 9. Abundancia de especies de flebótomos colectados en Lumbaquí-Sucumbios.

LOCALIDAD LUMBAQUI-SUCUMBIOS						
ESPECIES	ÉPOCAS DE COLECTA				TOTAL	
	SECA		LLUVIOSA			
	A. ABS.	A. REL.	A. ABS.	A. REL.	A. ABS.	A. REL.
Nyssomyia yuilli yuilli	0	0%	12	39%	12	24%
Nyssomyia yuilli	1	5%	5	16%	6	12%
Psychodopygus carrerai carrerai	0	0%	4	13%	4	8%
Psychodopygus carrerai	0	0%	3	10%	3	6%
Micropygomyia trinidadensis	1	5%	1	3%	2	4%
Psychodopygus davisi	0	0%	1	3%	1	2%
Psychodopygus sp..	0	0%	1	3%	1	2%
Lutzomyia tortura	3	15%	1	3%	4	8%
Lutzomyia paraensis	2	10%	2	6%	4	8%
Pressatia sp..	6	30%	1	3%	7	14%
Lutzomyia sp..	7	35%	0	0%	7	14%
TOTALES	20	100%	31	100%	51	100%

Como muestran los resultados de la tabla anterior, la especie con mayor abundancia en las dos temporadas es *Nyssomyia yuilli yuilli* (24%), sin embargo, este número está determinado por las colectas durante la temporada lluviosa, ya que durante la temporada seca no se registraron individuos de esta especie. En la época seca, *Lutzomyia* sp. fue la especie con mayor abundancia (35%), en tanto que en la época lluviosa la especie más abundante fue *Nyssomyia yuilli yuilli* (39%). A continuación se muestran los resultados obtenidos en la localidad de Puerto Quito, provincia Pichincha:

Tabla 10. Abundancia de especies de flebótomos colectados en Puerto Quito-Pichincha.

LOCALIDAD PUERTO QUITO-PICHINCHA						
ESPECIES	ÉPOCAS DE COLECTA				TOTAL	
	SECA		LLUVIOSA			
	A. ABS.	A. REL.	A. ABS.	A. REL.	A. ABS.	A. REL.
Lutzomyia tortura	1	4%	0	0%	1	3%
Psychodopygus panamensis	4	15%	3	38%	7	21%
Pressatia camposi	2	8%	0	0%	2	6%
Pressatia spp.	13	50%	1	13%	14	41%
Lutzomyia spp.	6	23%	3	38%	9	26%
Micropygomyia trinidadensis	0	0%	1	13%	1	3%
TOTALES	26	100%	8	100%	34	100%

Como puede observarse en la tabla anterior, la especie con mayor abundancia en las dos temporadas es *Pressatia* sp. (41%), también fue la especie más abundante en la temporada seca (50%). Las especies más abundantes en la época lluviosa fueron *Psychodopygus panamensis* (38%) y la *Lutzomyia* sp. (38%). En la localidad de Macas, en la provincia Morona Santiago, los resultados obtenidos en el análisis e identificación de flebótomos fue el siguiente:



Tabla 11. Abundancia de especies de flebótomos colectados en Macas-Morona Santiago.

LOCALIDAD MACAS-MORONA SANTIAGO						
ESPECIES	ÉPOCAS DE COLECTA				TOTAL	
	SECA		LLUVIOSA			
	A. ABS.	A. REL.	A. ABS.	A. REL.	A. ABS.	A. REL.
Nyssomyia yuilli yuilli	6	30%	4	9%	10	16%
Nyssomyia yuilli	0	0%	1	2%	1	2%
Psychodopygus davisi	2	10%	5	12%	7	11%
Psychodopygus carrerae carrerae	1	5%	3	7%	4	6%
Lutzomyia tortura	3	15%	8	19%	11	17%
Trichophoromyia ubiquitalis	0	0%	9	21%	9	14%
Nyssomyia	0	0%	6	14%	6	10%
Pressatia sp..	3	15%	4	9%	7	11%
Lutzomyia sp..	4	20%	3	7%		FORMATO IDENTICO PARA TODAS LAS
Psychodopygus sp..	1	5%	0	0%		
TOTALES	20	100%	43	100%		

FORMATO
IDENTICO PARA
TODAS LAS
TABLAS



Como se observa en los resultados de la tabla anterior, las especies con mayor abundancia en las dos épocas fueron *Lutzomyia tortura* (17%), seguida de *Nyssomyia yuilli yuilli* (16%), esta última también presentó la mayor abundancia en la temporada seca, mientras que en la temporada lluviosa el predominio de abundancia fue de la especie *Trichophoromyia ubiquitalis* (21%).

En la figura 13, se observa la abundancia de especies en cada localidad. En Puerto Quito-Pichincha, la especie más común fue *Pressatia* sp. (n=14), en Lumbaqui- Sucumbios *Nyssomyia yuilli yuilli* (n=12), en tanto que en la localidad de Macas-Morona Santiago se registró mayor predominancia de *Lutzomyia tortura* (n=11).

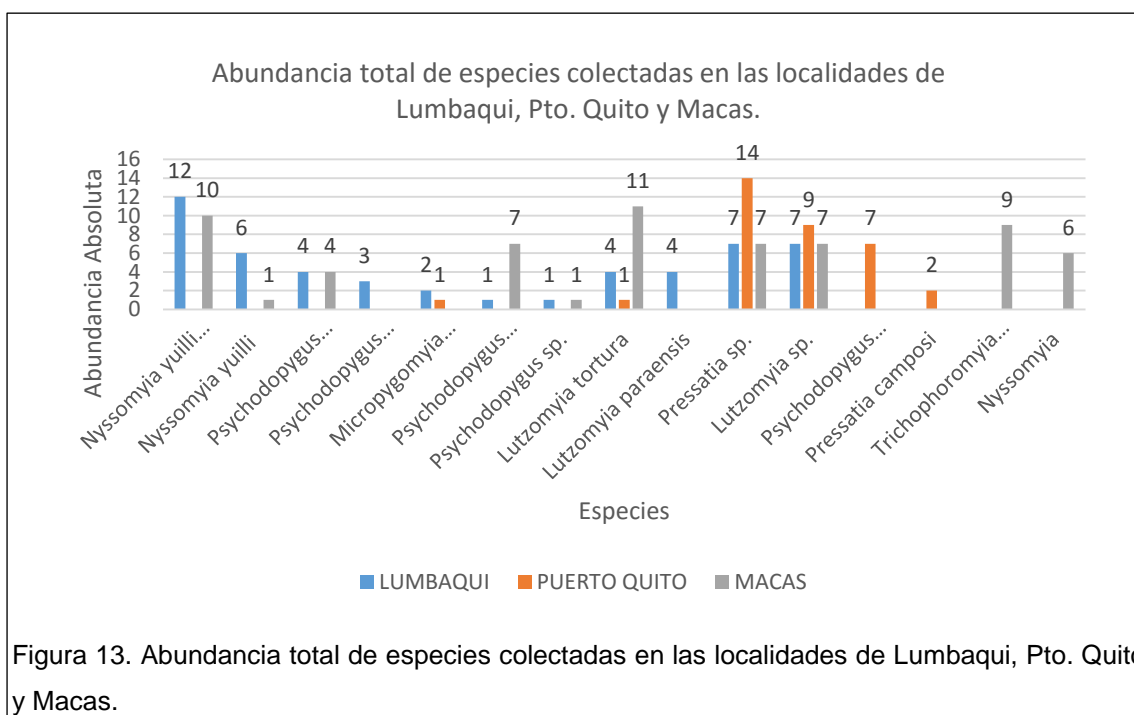
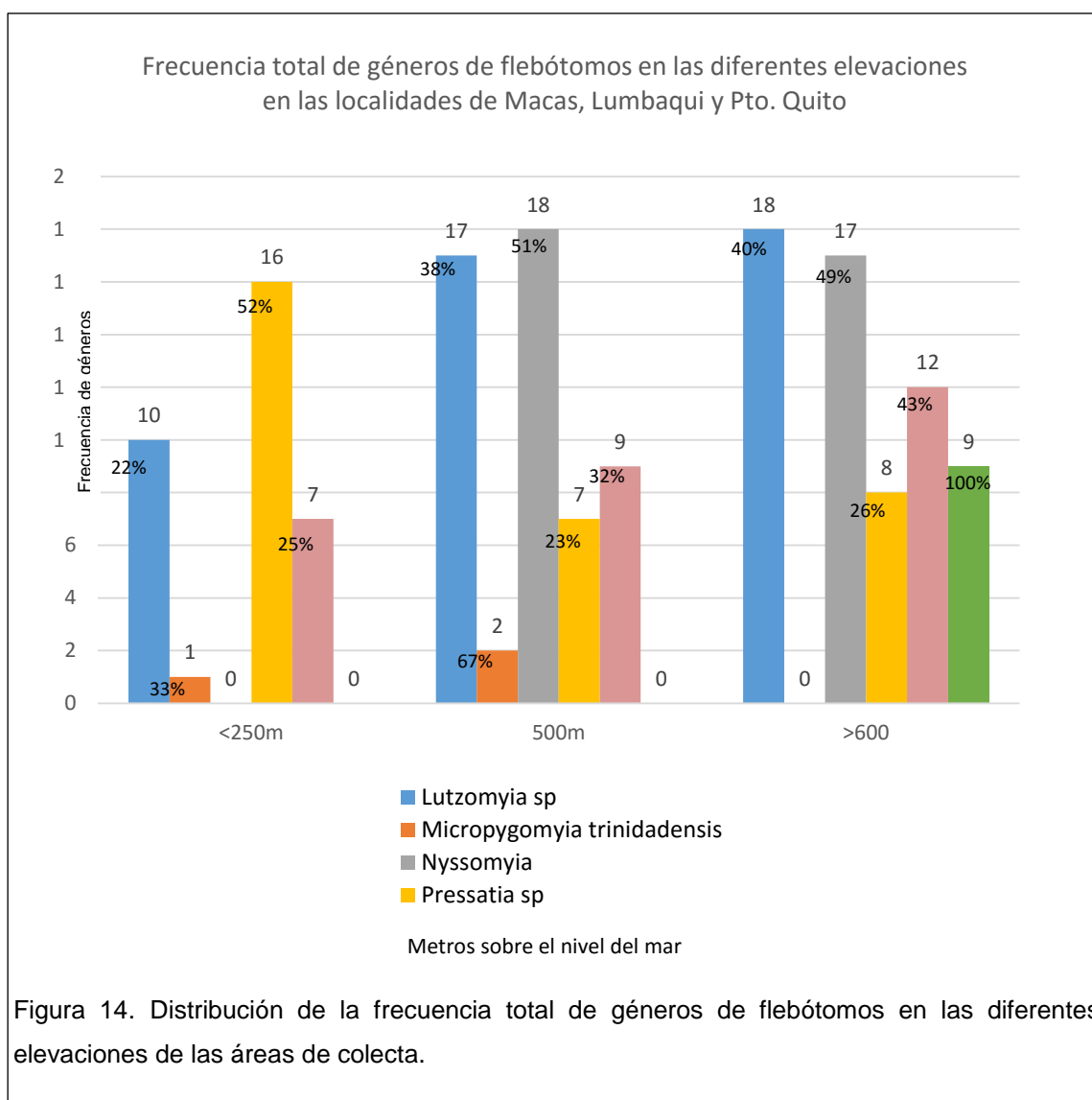


Figura 13. Abundancia total de especies colectadas en las localidades de Lumbaqui, Pto. Quito y Macas.

Al analizar las abundancias absoluta y relativa de las especies identificadas en función de las regiones de colecta, se puede observar que no existe un patrón general de distribución influenciado por la elevación.

Las especies del género *Lutzomyia* spp. presentaron mayor frecuencia por encima de los 500m y 600m, donde se localizaron el 38% y 40% respectivamente, lo mismo ocurre con las muestras del género de *Nyssomyia*,

que fueron abundantes en las zonas de mayor elevación con el 51% y 49% para los 500m y 600m respectivamente, no se registraron en las zonas bajas. El género *Pressatia spp.*, tuvo un mayor número entre 250 y 600m con un 52% y 26% correspondientemente, disminuyendo su frecuencia conforme aumenta la elevación; el caso de *Psychodopygus spp.* es distinto a los comportamientos anteriores, ya que se registraron valores similares en las tres categorías analizadas, con un leve incremento a medida que aumentó el nivel de elevación. En cuanto a la *Micropygomyia trinidadensis*, solo se colectó en las zonas de menor elevación, por el contrario la presencia de *Trichophoromyia ubiquitalis*, que registró únicamente en las zonas altas. A continuación se muestra el gráfico con el análisis realizado.



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

Para la detección de la presencia del parásito del género *Leishmania* dentro de hembras flebotomíneas con ingesta sanguínea, se utilizaron primers específicos para los parásitos del orden *Trypanosomatidae*, se consideró como resultado positivo la presencia de una banda.

Para el ensayo se utilizaron todas las muestras de ADN extraídas (146). De los 63 flebótomos colectados con ingesta en la localidad de Macas, 23 (36.5%) de los individuos presentaron infección con el parásito, mientras que 40 individuos (63.5%) no presentaron el parásito. En el caso de la localidad de Lumbaquí, de

los 49 flebótomos colectados con ingesta sanguínea, 24 individuos (48.9%) se encontraron infectados con el parásito mientras que 25 individuos (51.1%) no presentaron infección con el parásito. En Puerto Quito, de los 34 individuos con ingesta analizados, 19 individuos (55.9%) resultaron positivos con infección de *Leishmania*, mientras que el resto, 15 individuos (44.1%) no presentaron infección.

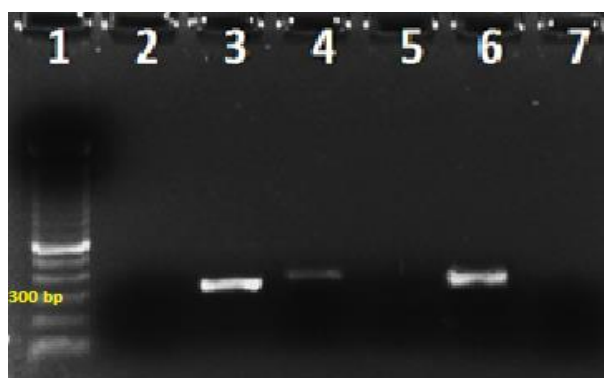


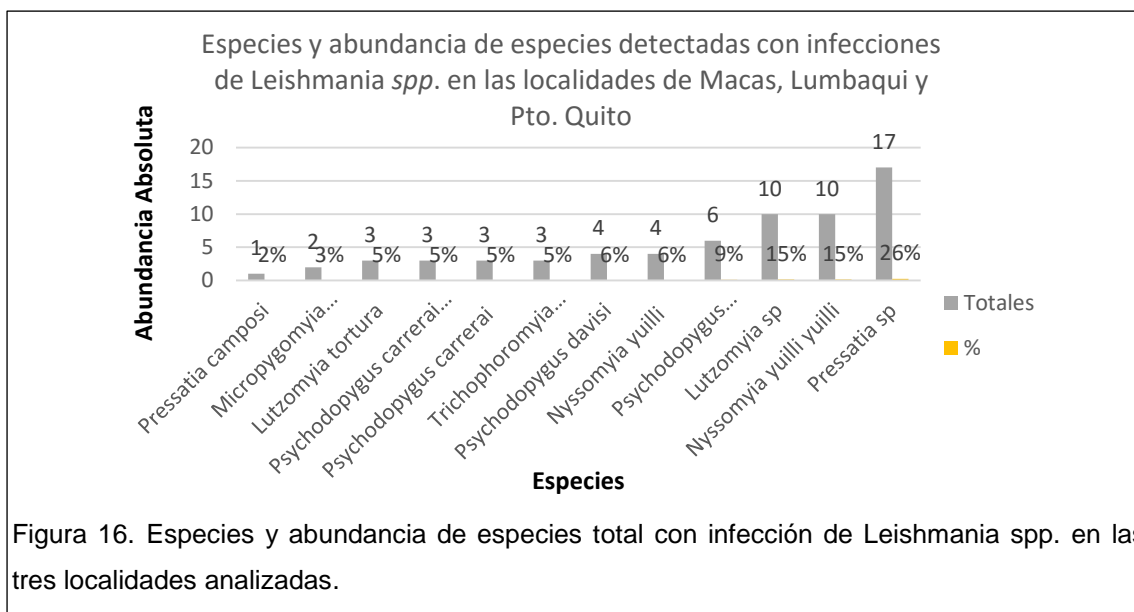
Figura 15. La línea 1, marcador molecular 100bp; línea 2, control negativo, línea 3- control positivo (*Lutzomyia mexicana*) línea 4-7, ADN de flebótomos con ingesta sanguínea, en gel de electroforesis (1%).

A partir de la información obtenida de los datos generados en dicho estudio experimental, se puede comprobar la distribución del parásito de acuerdo con las regiones de colecta y las especies. En el caso de la provincia de Sucumbíos, la colecta en época lluviosa tuvo mayores incidencias de resultados positivos (n=19) con relación a la temporada seca (n=5), en general, la especie que con mayor frecuencia presentó el parásito fue *Nyssomyia yuilli yuilli* (n=6), correspondiente al 25% del total de muestras positivas.

Por otro parte, en la provincia de Pichincha, la predominancia de resultados positivos fue durante la temporada seca (n=15), en la temporada lluviosa se obtuvieron un bajo número de (n=4) muestras positivas. En la localidad de Lumbaquí, la especie que predominó con infecciones positivas fue *Pressatia sp.* (n=9), que representa el 47% del total de resultados positivos por especie en esta área.

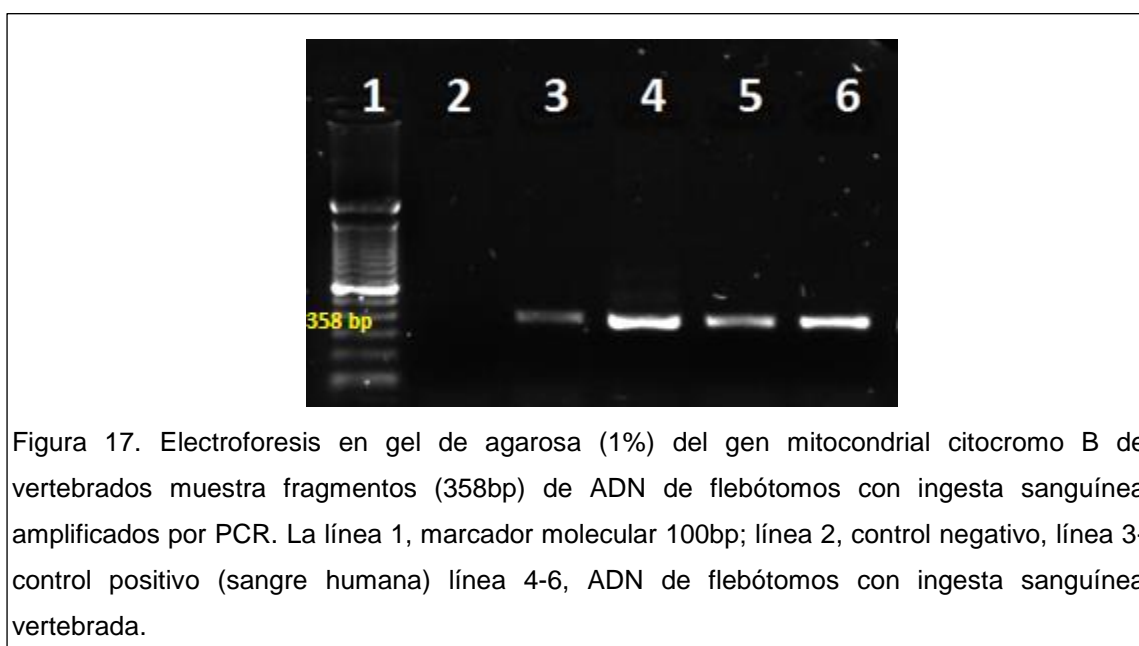
Finalmente, en la provincia de Morona Santiago, la temporada lluviosa tuvo mayores incidencias de flebótomos infectados (n=18), mientras que en la temporada seca se registraron (n=5) casos positivos. En esta localidad, la predominancia de respuestas positivas se presentó en dos especies en particular, *Pressatia sp.* (n=5) y *Lutzomyia sp.* (n=5); cada especie representa el 22% del total de la muestra de resultados positivos en dicha área.

De las especies de hembras con ingesta identificadas (n=148), el 43% presentaron infección natural con *Leishmania spp.*, la especie con mayor tasa de infección fue *Nyssomyia yuilli yuilli* (15%), sin embargo hay que considerar que el grupo de *Pressatia spp.* presentó una alta tasa (26%) de infección natural con el parásito (Figura 16).

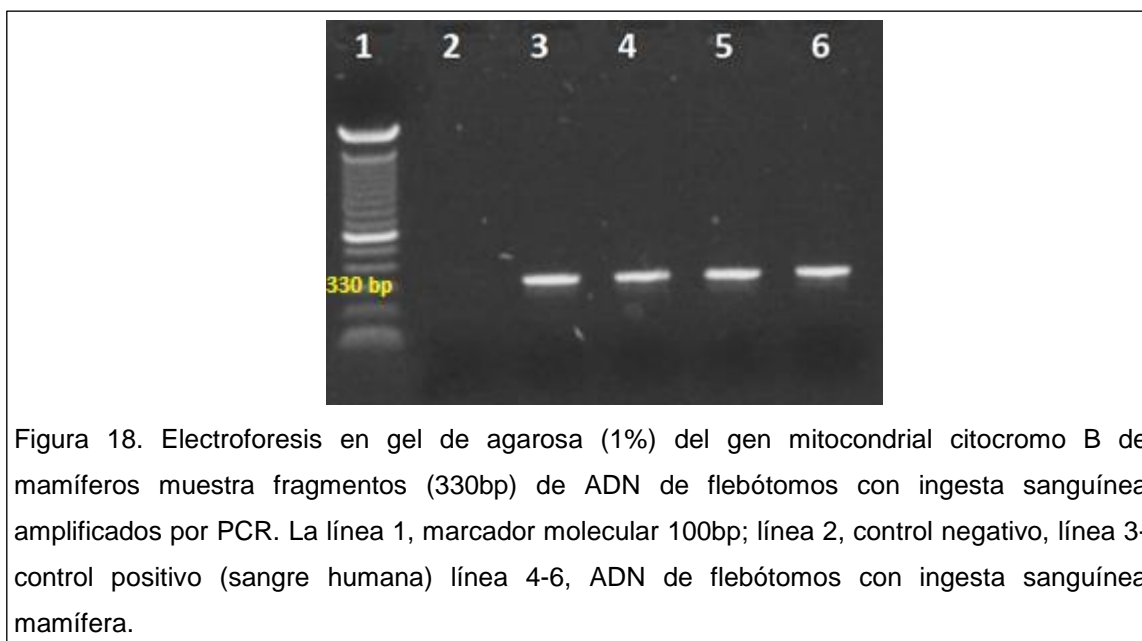


4.1 Determinación de las fuentes alimenticias de los flebótomos

Se realizó la extracción de ADN de 146 hembras con ingesta sanguínea para la identificación de potenciales fuentes de alimentación de los flebótomos. Después se realizó la amplificación de fragmentos correspondientes al *Subphylum Vertebrata*, con el objetivo de medir la efectividad del método de extracción. De las 146 muestras con ADN extraído, todas amplificaron para el tamaño del fragmento esperado (358 bp) (Figura 17).



Posteriormente, para la determinación de los animales de los cuales se alimentó el vector, se utilizaron primers específicos para la clase Mammalia (Figura 18). En este proceso se evaluó el gen nuclear prepronociceptina (PNOC), específico para mamíferos.



Con el protocolo estandarizado para la amplificación del gen PNOC, se analizaron 146 muestras positivas para vertebrados, 46 individuos corresponden a la localidad de Macas, 49 a la localidad de Lumbaquí y 34 a Puerto Quito. En la localidad de Macas se registraron 36 (78.2%) muestras positivas para mamíferos, en el caso de Lumbaquí, 24 (49%) resultaron de este grupo, mientras que en Puerto Quito, 20 (59%) fueron considerados dentro de esta clase.

Las muestras que dieron positivas para mamíferos fueron seleccionadas para la técnica de PCR-multiplex. Esta técnica permitió la identificación de importantes reservorios epidemiológicos del parásito y a su vez las fuentes de alimentación del vector. La Figura 19, muestra la amplificación específica del gen citocromo B para vaca (561 bp), perro (680 bp), humano (334 bp), cabra

(132 bp) y cerdo (453 bp). Además, la Figura 20, muestra la amplificación del gen del citocromo B del orden galliforme (210 bp).

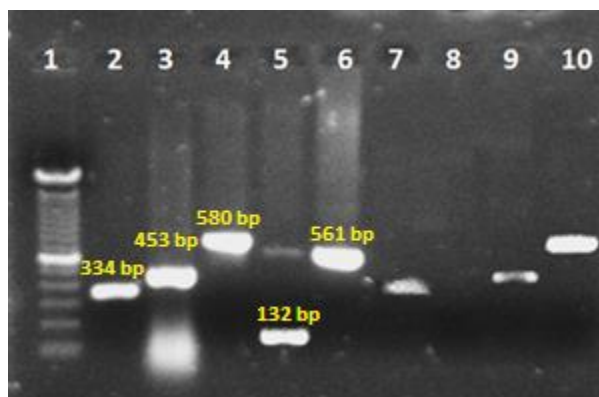


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa (1%) del gen mitocondrial citocromo B de vaca, perro, humano, cabra y cerdo de ADN de flebotomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR-multiplex. La línea 1, marcador molecular 100bp; línea 2-6, control positivo (sangre de humano (334 bp), cerdo (453 bp), perro (580 bp), cabra (132 bp) y vaca (561 bp)) línea 7-10, ADN de flebotomos con ingesta sanguínea mamífera.

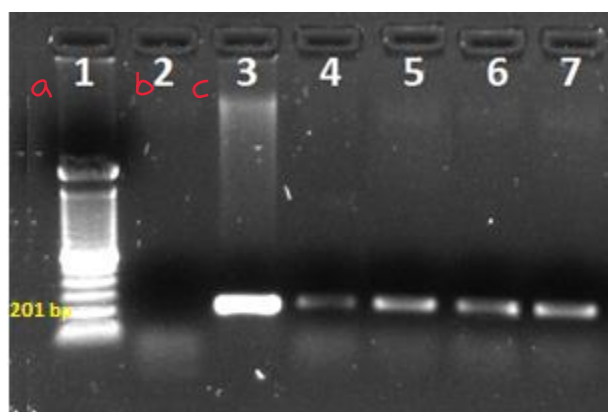
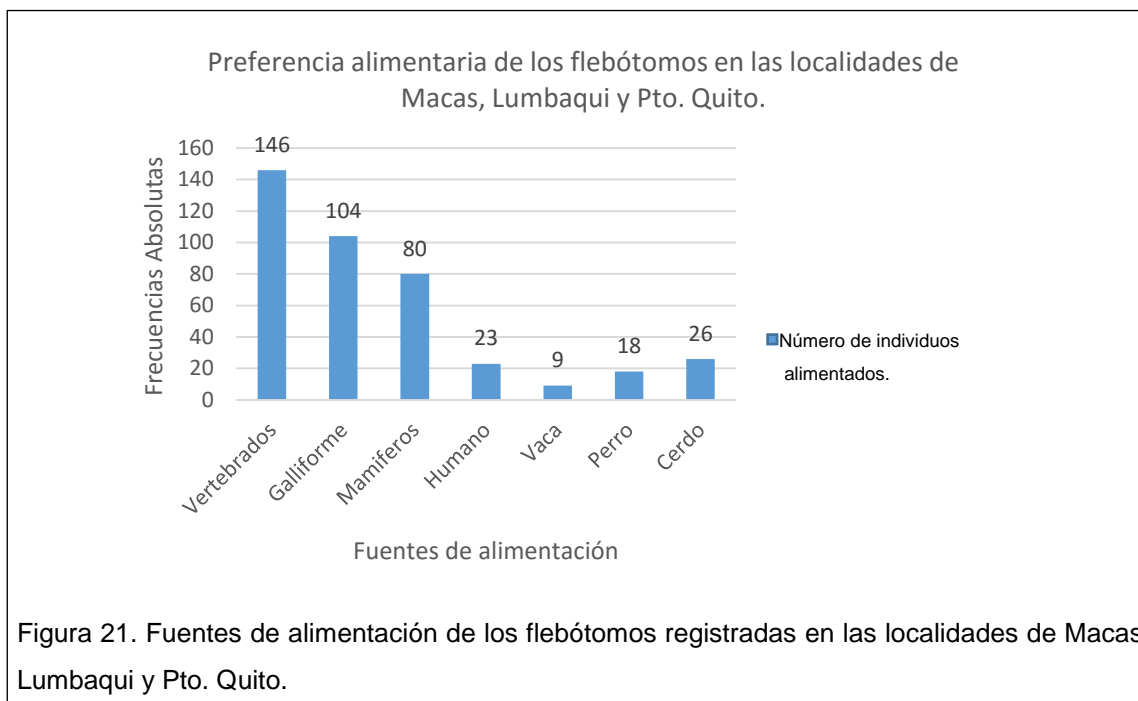


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa (1%) del gen mitocondrial citocromo B del orden galliforme (201 bp) de ADN de flebotomos con ingesta sanguínea amplificados por PCR-multiplex. La línea 1, marcador molecular 100bp; línea 2, control positivo (sangre de gallina); línea 3-7, ADN de flebotomos con ingesta sanguínea mamífera; línea 8, control negativo.

Los datos obtenidos después del análisis molecular dieron como resultado que las fuentes de ingesta sanguínea fueron: vertebrados (n=146), orden galliforme (n=104), mamíferos (n=80), humano (*Homo sapiens*) (n=23), vaca (*Bos taurus*)

(n=9), perro (*Canis lupus*) (n=18) y cerdo (*Sus scrofa*) (n=26); no habiéndose detectado ingestas de chivo en ninguna de las localidades ni temporadas (Figura 21).



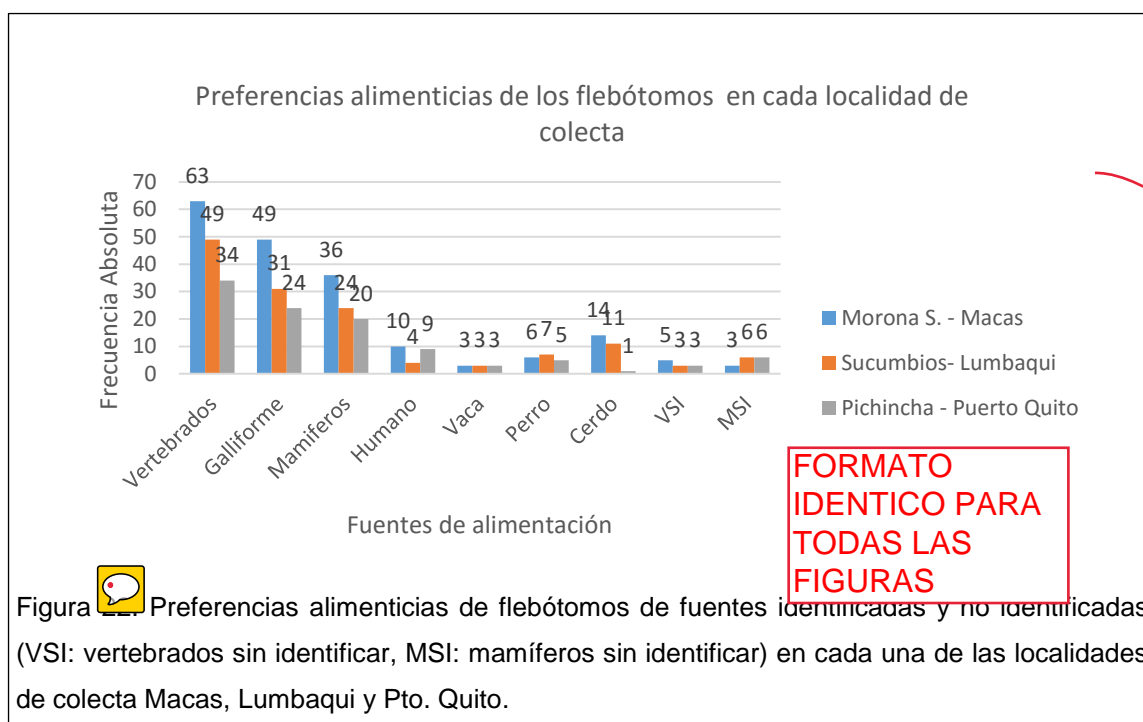
En el caso de la provincia de Morona Santiago, del total de la muestra con ingesta analizada (n=63), se detectó un total de 49 individuos con ingesta del orden Galliforme, de los cuales 15 (24% de la muestra total), fueron identificados en la temporada seca y 34 (54% de la muestra total) pertenecen a la colecta en la temporada de lluvia. Además, para la colecta en época seca se encontraron ingestas de humano (n=4) y cerdo (n=4) en primer orden de frecuencia, representado por un 6% del total de la muestra, seguido de la ingesta de perro (n=3) y vaca (n=2), representando el 5% y 3% respectivamente. En la colecta realizada en la temporada lluviosa, la mayor incidencia de ingestas estuvo dada por cerdos (n=10), equivalente al 16% de la muestra total, seguido de ingesta de humano (n=6), perro (n=3) y vaca (n=1), lo que representa el 10%, 5% y 2% respectivamente. Se determinaron además ingestas múltiples de perro-cerdo (n=1), humano-cerdo (n=1) y humano-perro (n=2).

En la provincia de Sucumbíos, del total de la muestra con ingesta analizada (n=49), se detectó un total de 31 individuos con ingesta del orden Galliforme, de los cuales 10 (20% de la muestra total), fueron identificados en la temporada seca y 21 (43% de la muestra total) pertenecen a la colecta en la temporada de lluvia. Además, para la colecta en época seca se encontraron ingestas de cerdo (n=4) en primer orden de frecuencia, representado por un 8% del total de la muestra, seguido de la ingesta de perro (n=3), humano (n=2) y vaca (n=1), representando el 6%, el 4% y 2% respectivamente; mientras que en la colecta realizada en temporada lluviosa, la mayor incidencia de ingestas estuvo dada por cerdos (n=7), equivalente al 14% de la muestra total, seguido de ingesta de perro (n=4), humano (n=2) y vaca (n=2), lo que representa el 8%, 4% y 4% respectivamente; se determinaron además ingestas múltiples de humano-perro (n=2) y humano-cerdo (n=1).

En la provincia de Pichincha, del total de la muestra con ingesta analizada (n=34), se detectó un total de 24 individuos con ingesta del orden Galliforme, de los cuales 18 (53% de la muestra total), fueron identificados en la temporada seca y 6 (18% de la muestra total) pertenecen a la colecta en la temporada de lluvia. Además, para la colecta en época seca se encontraron ingestas de humano (n=6) en primer orden de frecuencia, representado por un 18% del total de la muestra, seguido de la ingesta de perro (n=3) y vaca (n=2), representando el 9% y 6% respectivamente; mientras que en la colecta realizada en temporada lluviosa, la mayor incidencia de ingestas estuvo dada igualmente por humanos (n=3), equivalente al 9% de la muestra total, seguido de ingesta de perro (n=2), cerdo (n=1) y vaca (n=1), lo que representa el 6%, 3% y 3% respectivamente. Se determinaron además ingestas múltiples de humano-perro (n=2) y humano-cerdo (n=1).

Un grupo de muestras de ADN no correspondieron a los primers considerados como los más comunes. Parte de ellos que resultaron negativos para las pruebas de PCR-Multiplex y PCR de orden Galliforme se los clasificó como mamíferos no identificados (MNI), el otro grupo que resultó negativo para la

prueba de PCR-Multiplex y la prueba de PCR en mamíferos, se le asignó el nombre de vertebrados no identificados (VNI). En las figuras a continuación, puede observarse los reportes de las fuentes de alimentación para las tres localidades analizadas (Figura 22).



Como puede observarse en la figura anterior, el número de vertebrados y mamíferos sin identificar es mínimo comparado con el resto de las fuentes que resultaron positivas para los primers escogidos. Además, se puede considerar que el diseño de la PCR-Multiplex con los primers considerados (humano, vaca, perro, cerdo y chivo) fue apropiado.

Capítulo V. Discusión

5.1 Composición taxonómica de flebótomos

El uso de trampas CDC ha sido de utilidad en las capturas de flebotomíneas. Esta técnica descrita por Alexander et al. (1992) “ha sido utilizada ampliamente en estudios sobre flebótomos, por lo que los resultados pueden ser comparables”. La técnica señala que “la colección de un mayor número de hembras flebotomíneas es debido a que el crecimiento de la población y su eficacia biológica va a depender del mayor número de hembras que exista” (Valderrama, et al., 2011). En este estudio se lograron recolectar un total de 987 hembras flebotomíneas y 758 machos en las tres localidades analizadas. Palacios (2015) en su investigación sobre las preferencias alimenticias de flebótomos en el Ecuador, al igual que en este estudio reporta una mayor proporción de hembras flebotomas.

A pesar de que el estudio de la taxonomía de flebotominos ha recibido atención por su condición de vectores de patógenos, aún falta información para una mayor precisión al momento de identificar. La identificación con base en análisis de las diferencias morfológicas y morfométricas presenta limitaciones, pues requiere experiencia y habilidad tanto en los procesos de montaje como en el análisis de las estructuras internas. Las técnicas moleculares han sido empleadas para mejorar las desventajas de las técnicas morfológicas. La identificación a nivel molecular proporciona por una parte mayor precisión en la clasificación de especies. Varios investigadores mencionan que la información que se genera a partir de los métodos moleculares no son del todo capaces de determinar los niveles taxonómicos de una especie determinada, y que por otro lado, los datos morfológicos brindan información importante pero no toda la necesaria (Hillis, et al., 1996). Contreras, et al., (2014) en su estudio “Código de barras de ADN para la identificación de especies de moscas de arena (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) en Colombia”, concluye que en el grupo de los flebótomos, la asignación de las especies requiere del uso combinado de

valores de divergencia de nucleótidos y el uso de claves taxonómicas con base en diferencias morfológicas y morfométricas. Una de los limitantes para el uso de identificación a nivel molecular, es el costo que implica el procesamiento de las muestras. En este estudio la clasificación taxonómica se basó en claves dicotómicas; en el proceso de identificación se alcanzó el mayor nivel taxonómico posible, todos los especímenes fueron identificados hasta el nivel de género y en menor cantidad se llegó a determinar la especie.

En este estudio se identificaron seis géneros y 15 sub-géneros de flebotomos en las tres localidades estudiadas: *Nyssomyia yuilli yuilli*, *Nyssomyia yuilli*, *Nyssomyia*, *Psychodopygus carrerai carrerai*, *Psychodopygus carrerai*, *Psychodopygus davisii*, *Psychodopygus sp.*, *Psychodopygus panamensis*, *Micropygomyia trinidadensis*, *Lutzomyia tortura*, *Lutzomyia paraensis*, *Lutzomyia spp.*, *Pressatia spp.*, *Pressatia camposi* y *Trichophoromyia ubiquitalis*; cada una de estas especies se ha reportado en el país en diferentes provincias (Alexander et al., 1992; Gomez et al., 2014; Young, D. G. & Duncan, M.A., 1994; Jones, L. 2010; Galati, E. 2003).

Las especies con mayor frecuencia fueron: la *Pressatia sp.* (Young y Duncan) en 18.9%, *Lutzomyia sp.* (Young y Duncan) con 15.5%, *Nyssomyia yuilli yuilli* (Young y Porter) con 14.9% y la *Lutzomyia tortura* (Young y Rogers) con el 10.8%.

La especie *Lutzomyia tortura* (Young y Rogers), fue colectada en las tres localidades analizadas: Macas, Puerto Quito y Lumbaquí. Trabajos anteriores reportan a *L. tortura* en las provincias de Esmeraldas, Orellana, Morona Santiago y Pastaza (Alexander et al., 1992; Gomez et al., 2014; Jones et al., 2010). En Pichincha y Sucumbíos, los reportes no señalan las localidades específicas de colecta; este estudio confirma la presencia de esta especie en estas provincias y aporta con información de localidades específicas donde se encontró a la especie *L. tortura*, esto es en Puerto Quito y Lumbaquí.

La especie *Nyssomyia yuilli yuilli* (Young y Porter), ha sido colectada en las provincias de Morona y Sucumbíos, lo cual es coincidente con los reportes que se tienen en la actualidad, tales como el caso del estudio realizado por Alexander et al. (1992) y Gomez et al., 2014). Efectivamente, esta especie no tuvo presencia en la provincia de Pichincha.

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

Gomez et al., 2014, resume una lista de especies y su distribución registrada por él y otros estudios desde el año 1982 al 2014, estos datos reportan un total de 42 especies de *Lutzomyia*. De estas, 31 especies están registradas en las provincias de Pichincha, Morona Santiago y Sucumbíos. En este estudio se reportan 15 especies en las tres provincias, lo que corresponde a la mitad de las especies previamente registradas.

Cada temporada presentó diferente distribución espacio-temporal. En Sucumbíos y Morona Santiago se observó que en temporada lluviosa la colecta de individuos fue mayor que en la temporada seca, lo contrario se observó en la colecta realizada en Pichincha.

En el análisis espacio-temporal de la distribución de las hembras alimentadas y sin alimentar en las zonas de colecta, se observó que en las tres localidades analizadas, la mayor cantidad de muestras con y sin ingesta se obtuvieron en la zona de bosque, y esta va disminuyendo a medida que se acerca a la zona domiciliar. Este patrón aplica a la localidad de Lumbaquí, en Puerto Quito y Macas las mayores concentraciones se encontraron en las zonas domiciliar y peri-domiciliar respectivamente. Esta variación, pudo haber sido consecuencia de la temperatura y humedad relativa del lugar de colecta, factores que influyen en el desarrollo y actividad del vector, (Perez et al., 2014).

Estos resultados muestran un alto riesgo de transmisión de enfermedades, ya que la distribución espacial del vector está cerca de las zonas habitadas. “La cercanía de los flebótomos a zonas pobladas es por la facilidad de alimento que poseen, la crianza de ganado vacuno, bovino, porcino y animales domesticados que atraen a las especies zoofílicas de flebótomos” (Kato et al., 2007). En Panamá, se ha reportado una relación entre la presencia de especies de flebótomos con la presencia de animales domésticos y de corral (Calzada et al., 2015).

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

Del total de 146 muestras amplificadas, como resultado del análisis de la región espaciadora del transcrita interno (ITS1), se observa que el 45% presentó infecciones naturales. La tasa de infección en Puerto Quito fue de 56% en Lumbaquí de 49% y en Macas de 36.5%. Se puede considerar estas tasas como elevadas, ya que de acuerdo a los reportes del Ministerio de Salud Pública, estas provincias se registran una alta incidencia de casos reportados de *Leishmaniasis*.

Debido a la cercanía taxonómica de los géneros *Leishmania* y *Endotrypanum* es posible una confusión en los resultados debido a la alta similitud genética y probada relación evolutiva (Cupillo, et al., 1998; Fernandes, et al., 1993). La forma ideal para conocer las especies de *Leishmania* es con secuenciación, ya que los dos géneros son de la familia Trypanosomatidae (Kato et al., 2007; Zapata, et al., 2012). Kato et al. (2005) encontró que el ADN del parásito encontrado dentro del abdomen de lutzomyias pertenecía a *Endotrypanum*, estos individuos fueron colectados en zonas endémicas de *leishmaniasis*.

Los resultados de las fuentes de ingesta sanguínea muestran que los animales del género galliforme son la principal fuente de alimentación (64.7%) de los flebótomos. De acuerdo a Afonso (2012), los individuos de *Gallus gallus*

presentar infección con el parásito *Leishmania*, no desarrollan sintomatología, por lo que se puede considerar como huesped primario.

Esto es un indicio de que los criaderos de gallinas de estas localidades tienen incidencia en el desarrollo epidemiológico de la enfermedad. Los huéspedes primarios facilitan la perpetuación de la enfermedad en el entorno, constituyendo un reservorio del parásito.

Para la identificación de especies mediante la amplificación de la región ITS1, se consideran las secuencias que son altamente conservadas dentro de la mayoría de genes del nrADN, útiles para el diseño de oligonucleótidos considerados como universales. Estos facilitan la amplificación de los ITS mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa. La secuencia altamente conservada del gen 5.8S, ha sido utilizada como punto de unión de cebadores universales para amplificar las regiones espaciadoras flanqueantes y el ITS, que es de gran utilidad para establecer relaciones filogenéticas y se pueden amplificar con cantidades pequeñas de ADN. Monroy-Ostria, et al., (2014) evaluaron el ensayo de PCR-RFLP para los genes de ITS1 en la determinación directa de varias especies de *Leishmania*, concluyendo que permite la identificación de especies infecciosas de *Leishmania* en América, en tiempo relativamente corto y con bajos costos.

5.3 Detección de fuentes alimentarias de los flebótomos

El uso del marcador genético PNOC ha sido usado y probado en previas investigaciones, mostrando una alta sensibilidad en la detección de las fuentes de la sangre ingestada por flebótomos. También ha sido efectivo en la evaluación de las preferencias de los insectos hacia los hospederos en condiciones naturales, evidenciando el uso de este marcador como una herramienta efectiva en la identificación de fuentes alimentarias de flebótomos (Haouas et al., 2007).

Los datos obtenidos después del análisis molecular de fuentes alimentarias más frecuente fue el orden Galliforme (*Gallus gallus*) (n=49) seguido de humano (*Homo sapiens*) (n=10); cerdo (*Sus scrofa*) (n=14), perro (*Canis Lupus*) (n=6) y vaca (*Bos taurus*) (n=3), donde además se detectaron ingestas mixtas de perro-cerdo (n=1), humano-cerdo (n=1) y humano-perro (n=2). En el caso de la colecta realizada en Lumbaquí, provincia Sucumbíos, del total de la muestra con ingesta analizada (n=49), la mayor parte presenta ingesta del orden Galliforme (n=31), también se detectaron otras fuentes de alimentación como el cerdo (*Sus scrofa domesticus*) (n=11), perro (*Canis Lupus*) (n=7), humano (*Homo sapiens*) (n=4) y vaca (*Bos taurus*) (n=3), y se determinaron además, ingestas mixtas de humano-perro (n=2) y humano-cerdo. En Puerto Quito, de un total de 34 individuos con ingestas, se obtuvieron como fuentes alimenticias: gallina (*Gallus gallus*) (n=24); humano (*Homo sapiens*) (n=9); cerdo (*Sus scrofa domesticus*) (n=1), vaca (*Bos taurus*) (n=3) y perro (*Canis Lupus*) (n=5); donde además, las ingestas mixtas estuvieron dadas por humano-perro (n=2) y humano-cerdo (n=1).

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

La abundante ingesta del orden galliforme en los datos recolectado en esta investigación corroboran los datos obtenidos por Afonso et al.(2012). en Brasil, donde la principal fuente de alimentación es la aviar. Además se confirma el

comportamiento oportunista que poseen los flebótomos, ya que su alimentación se basa en la disponibilidad y abundancia de alimento disponible (Abbasi et al., 2009; Chaves, et al., 2010; Marins de Auiar, 1996).

La información generada en este estudio sobre las fuentes de alimentación de flebótomos, como vectores de *Leishmania*, tiene importantes aportes para el entendimiento del ciclo de vida de este parásito. El manejo de las estrategias de control de la enfermedad, puede ser eficiente considerando los datos de este estudio, que incluyen la detección de especies de vectores que transmiten enfermedades a humanos, su grado de afinidad por sangre humana y la identificación de los hospederos que tiene el parásito (Afonso et al., 2012; Claborn, 2010; Gonzalo, 2014).

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones



En las localidades de Lumbaqui y Macas, la mayor cantidad de hembras fueron colectadas durante la época lluviosa. En la localidad de Puerto Quito la mayor abundancia fue durante la época seca.

La riqueza de especies (diversidad) registrada en este estudio (n=15) en las provincias de Pichincha, Morona Santiago y Sucumbíos corresponde al 48% del total de especies reportadas para estas provincias. En las dos épocas del año las especies más predominantes fueron *Lutzomyia tortura* en Macas (Morona Santiago), *Nyssomyia yuilli yuilli* en Lumbaquí (Sucumbíos) y *Pressatia* sp. En Puerto Quito (Pichincha).

La abundancia total de individuos con y sin ingesta, fue mayor en la zona de bosque, seguido de las áreas peridomiciliares y finalmente las áreas domiciliarias, este patrón puede estar correlacionado con la diversidad de hábitats y de localidades específicas de colecta.

La preferencia alimentaria más frecuente fue el orden Galliforme, también se detectó otras fuentes importantes como es el caso de mamíferos, entre los que se encuentran: el cerdo, el humano, el perro y la vaca. La presencia de ingestas mixtas tuvo lugar en las tres localidades, esto confirma la conducta oportunista del vector.

El 45% de los flebótomos con ingesta sanguínea presentaron infección con *Leishmania* spp. *Pressatia* sp. fue la especie de flebótomos que presentó una mayor frecuencia de infección. La principal fuente de alimentación fueron las gallinas, considerados como huéspedes primarios

6.2 Recomendaciones

El uso de las trampas CDC fue exitoso para la investigación, no obstante, se recomienda complementar con el uso de trampas de cebo humano, que también son eficaces en la colecta de flebótomos.

En la planificación del trabajo de campo, se recomienda considerar colectas en diferentes estaciones climáticas. Al momento de ensamblar las trampas se recomienda buscar ambientes que reúnan las características preferenciales para los flebótomos, como lugares cerca de corrales, riveras de ríos, áreas con vegetación espesa, cerca de madrigueras de animales silvestres, lugares con poca luz y en horarios crepusculares. Esto incrementará las posibilidades de coleccionar mayor abundancia y diversidad de hembras con ingesta.

En la detección de infección con *Leishmania* se sugiere el uso de otros marcadores moleculares que brinden mayor precisión en la identificación de especies de *Leishmania*.

Se recomienda realizar investigaciones de este tipo en otras localidades que reportan altos índices de *Leishmaniasis*, así como realizar un monitoreo continuo en colaboración con las organizaciones pertinentes.

Se recomienda considerar la información generada en esta investigación, por parte de los departamentos de salud pública pertinentes encargados del control epidemiológico de Ecuador, como evidencia actualizada que favorezca en la toma de decisiones respecto a medidas de prevención y protección contra enfermedades producidas por estos vectores.

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

REFERENCIAS

Autor, (Año)
INEC, (s.f)

Tema o Título

sangría
francesa

Recuperado el 24 de febrero de 2017

de <http://www.> NO subrayado

- Abbasi, I., Cunio, R. y Warburg, A. (2009). Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. Vector Borne Zoonotic Dis, Recuperado el 10 de febrero de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18973440>
- Afonso, M., Duarte, R., Miranda, S., Santana, E. y Rangel, E. (2012). Studies on the feeding habits of Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of Aamerican visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. J Trop Med, 2012. Recuperado el 13 de marzo de 2015 de <https://www.hindawi.com/journals/jtm/2012/858657/>
- Alexander, B., Takaoka, H., Eshita, Y., Gomez, E. y Hashighuchi, Y. (1992). New records of phlebotomine sand flies (Diptera Psychodidae) from Ecuador. Recuperado el 20 de abril de 2015 de [http://www.scielo.br/pdf/mioc/v87n1/vol87\(f1\)_116-123.pdf](http://www.scielo.br/pdf/mioc/v87n1/vol87(f1)_116-123.pdf)
- Alvar, J., Vélez, I., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., et al. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Recuperado el 11 de junio de 2015 de <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035671>
- Amora, S., Bevilaqua, C., Feijó, F., Alves, N. y Maciel, M. (2009). Control of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. Neotropical entomology. Recuperado el 24 de febrero de 2016 de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2009000300001
- 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 for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. Recuperado el 10 de mayo de 2016 de <http://blogs.udla.edu.ec/ditc/files/2015/10/1-s2.0-S0001706X15301029-main-1i9m1xu.pdf>

- Armijos, R., Weigel, M., Izurieta, R., Racines, J., Zurita, C., Herrera, W., et al. (1997). The Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Subtropical Ecuador. *Tropical Medicine and International Health*. Recuperado el 10 de noviembre 2014 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9472299>
- Ashford, R. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol*. Recuperado el 27 de marzo de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8889331>
- Berry, E., Guergova-Kuras M, Huang, L. y Crofts, A. (2000). Structure and Function of Cytochrome bc Complexes. *Ann Rev Biochem*. Recuperado el 14 de agosto de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966481>
- Calvopiña, M., Armijos, R. y Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador.
- Calvopiña, M., Llor, R., Lara, F., Zambrano, P. y Hashiguchi, Y. (2012). Prevalencia y formas clínicas de las Leishmaniasis en el noroccidente de la provincia de Pichincha–Ecuador. Recuperado el 25 de agosto de 2015 de https://www.researchgate.net/publication/289080426_Prevalencia_y_formas_clinicas_de_las_leishmaniasis_en_el_noroccidente_de_la_provincia_de_Pichincha_-_Ecuador
- Calvopiña, M., Martinez, L. y Hashiguchi, Y. (2013). Cutaneous leishmaniasis "chiclero's ulcer" in subtropical Ecuador. Recuperado el 13 de abril de 2015 de <http://www.ajtmh.org/content/89/2/195.short>
- Calzada, J., Saldaña, A., Gonzalez, K., Rigg, C., Pineda, V., Santamaria, A., et al. (2015). Cutaneous Leishmaniasis in dogs: is high seroprevalence indicative of a reservoir role. Recuperado el 18 de junio de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4531497/>
- Chang, M., Teng, H., Chen, C., Chen, Y. y Jeng, C. (2008). The resting sites and blood-meal sources of *Anopheles minimus* in Taiwan. Recuperado el 24 de julio de 2016 de

<https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-7-105>

- Chaves, L., Harrington, L., Keogh, C., Nguyen, A. y Kitron, U. (2010). Blood feeding patterns of mosquitoes: random or structured. Recuperado el 22 de febrero de 2015 de <https://frontiersinzoology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-9994-7-3>
- Chow-Shaffer, E., Sina, B., Hawley, W., De Benedictis, J. y Scott T. (2000). Laboratory and field evaluation of polymerase chain reaction-based forensic DNA profiling for use in identification of human blood meal sources of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Recuperado el 30 de abril de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10916289>
- CIDEIM. Manual de Entomología Médica para Investigadores de América Latina. 1994. Recuperado el 16 de noviembre de 2014 de <http://www.worldcat.org/title/manual-de-entomologia-medica-para-investigadores-de-america-latina/oclc/318462594>
- Claborn, D. (2010). The biology and control of leishmaniasis vectors. Recuperado el 8 de junio de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2889652/>
- Cochero, S. (2002). Papel de *Lutzomyia evansi* (Diptera:Psychodidae) como vector de leishmaniasis visceral en un foco en los Montes de María. Recuperado el 21 de agosto 2015 de <http://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/rt/prINTERFriendly/3730/3945>
- Contreras, M., Vivero, R., Vélez, I., Porter, Ch. y Uribe, S. (2014). Dna Barcoding for the identification of sand flies species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in Colombia. Recuperado el 16 de mayo 2016 de <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0085496>
- Córdova, O., Vargas, F., Hashiguchi, Y., Kato, H. y Gómez, E. (2011). Identificación de especies de *Leishmania* en pacientes y

- flebotominos en áreas de transmisión en una región del Perú. Recuperado el 25 de junio de 2015 de <http://www.redalyc.org/pdf/363/36321259007.pdf>
- Cupillo, E., Moomen, H. y Grimaldi, J. (1998). Genetic diversity in natural population of New World Leishmania. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93(5), 663-668.
- Davies, C., Reithinger, R., Campbell-Lendrum, D., Feliciangeli, D., Borges, R. y Rodriguez, B. (2000). The Epidemiology and Control of Leishmaniasis in Andean Countries. *Cadernos de Saúde Pública*, 16(4), 925-950.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. Recuperado el 23 de agosto 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225981>
- Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2015). Gaceta Epidemiológica. Recuperado el 4 de octubre de 2015 de <http://www.salud.gob.ec/gaceta-epidemiologica-ecuador-sive-alerta/>
- Dostálová, A. y Volf, P. (2012). Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors*. Recuperado el 28 de noviembre de 2015 de <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-276>
- Fernandes, A., Nelson, K. y Beverley, S. (1993). Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Recuperado el 10 de diciembre de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC48033/>
- Galati, E. (2003). Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América, pp. 53-175. En: Rangel, E. F.; Lainson, R. (eds.). *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio do Janeiro, Brasil. 368 p.

- Garcia-Rejon, J., Blitvich, B., Farfan-Ale, J., Loroño-Pino, M., Chi Chim, W., Flores-Flores, L., et al. (2010). Host-feeding preference of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, in Yucatan State, Mexico. Recuperado el 17 de octubre de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3014751/>
- Esguerra, G. (2014). *Vacuna desarrollada por investigadores de la UDCA podría prevenir una enfermedad olvidada: Leshmaniasis*. Recuperado el 12 de julio de 2016 de <http://ireport.cnn.com/docs/DOC-1077439>
- Gomez, E., Kato, H. y Hashiguchi, Y. (2014). Man-biting sand fly species and natural infection with the *Leishmania* promastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. Recuperado el 20 de diciembre de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25063388>
- Guamán, I., Armijos, M. y Mancheno, J. (2013). Leishmaniasis Cútanea. Recuperado el 20 de julio de 2016 de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis>
- Haouas, N., Pesson, B., Boudabous, J., 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. Recuperado el 1 de agosto de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18165521>
- Hashiguchi, K., Velez, N., Kato, H., Criollo, F., Romero, A., Gomez, L., et al. (2014). Sand fly fauna (Diptera, pcyhodidae, phlebotominae) in different leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. Recuperado el 22 de octubre de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4287492/>
- Hillis, D., Moritz, C., Mable, B. y Olmstead, R. (1996). Molecular systematics (Vol. 23): Sinauer Associates Sunderland, MA.
- Hotez, P., Molyneux, D., Fenwick, A., Kumaresan, J., Sachs, S., Sachs, J., et al. (2007). Control of Neglected Tropical Diseases. Recuperado el 26

de noviembre de 2015 de
<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra064142>

INS, Instituto Nacional de Salud de Colombia. (s.f.). Gestion para la vigilancia y entomologica y control de la transmision de chagas. Recuperado el 19 de julio 2016 de <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Chagas/03%20Vigilancia%20Entomo%20chagas.pdf>

INSPI, Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, Ecuador, 2016. Recuperado el 24 de julio de 2016 de <http://www.salud.gob.ec/instituto-nacional-de-investigacion-en-salud-publica-inspi/>

Jones, L., Cohnstaedt, L., Beati, L., Teran, R., Leon, R. y Munstermann, L. (2010). New Records of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from Ecuador. Recuperado el 23 de agosto de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3357946/>

Kato, H., Uezato, H., Gomez, E., Terayama, Y., Calvopiña, M., Iwata, H., et al. (2007). Establishment of a Mass Screening Method of Sand Fly Vectors for Leishmania Infection by Molecular Biological Methods. Recuperado el 10 de noviembre de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17690406>

Kato, H., Uezato, H., Katatura, K., Calvopiña, M., Marco, J., Barroso, P., et al. (2005). Detection and identification of Leishmanias species within naturally infected in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. Recuperado el 14 de agosto de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728872>

Kent, R. y Norris, D. (2005). Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. Recuperado el 18 de diciembre de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103600>

Killick-Kendrick, R. (1999). The Biology and Control of Phlebotomine Sandflies. Clinics in dermatology. Recuperado el 26 de febrero de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384867>

- Lah, E., Ahamad, M., Haron, M. y Ming, H. (2012). Establishment of a molecular tool for blood meal identification in Malaysia. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(3), 223-227.
- Lewis, D. (1974). The biology of Phlebotomidae in relation to leishmaniasis. *Annual Review of Entomology*. Recuperado el 21 de febrero de 2014 de <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.en.19.010174.002051>
- Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, M., Javadian, E., Rassi, Y., Sadraei, J. y Mohtarami, F. (2009). Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays. Recuperado el 8 de octubre de 2015 de <http://jad.tums.ac.ir/index.php/jad/article/view/40.pdf/0>
- Marassa, A., Consales C. y Galati E. (2004). Enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method standardization, for identification of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* bloodmeals (Lutz & Neiva, 1912). Recuperado el 30 de noviembre de 2015 de http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822004000600003&script=sci_arttext&tlng=pt
- Marassa, A. Consales C. Galati E. y Nunes V. (2006). Blood meals identification of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *almerioi* (Galati & Nunes, 1999) by enzyme-linked immunosorbent assay biotin-avidin. Recuperado el 17 de octubre de 2015 de http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822006000200010&script=sci_arttext
- Marins de Aguiar, M., Muniz de Medeiros, W., Santos De Marco, T., Corrêa dos Santos, S. y Gambardella, S. (1996). Ecologia dos flebotomíneos da Serra do Mar, Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Públ.* Recuperado el 13 de agosto de 2015 de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1996000200008

- 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. Recuperado el 5 de diciembre de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22924419>
- Meece, J., Reynolds C., Stockwell P., Jenson T., Christensen J. y Reed K. (2005). Identification of mosquito bloodmeal source by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the cytochrome B gene. Recuperado el 28 de junio de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16119557>
- Ministerio de salud. (s.f.). Situación epidemiológica de la Leishmaniasis, Perú 2014 (SE 53) y 2015 (SE 9). Bol. Epidemiol. (Lima) 24 (9).
- Mollereau, C., Simons, M., Soularue, P., Liners, F., Vassart, G., Meunier J. y Parmentier M. (1996). Structure, tissue distribution and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. Recuperado el 12 de agosto de 2015 de https://books.google.com.ec/books?id=W3csAQAAIAAJ&pg=PA100&lpg=PA100&dq=3:+8666-8670&source=bl&ots=YuSlbSgdHC&sig=xFyzCfRt-mLHK8jQ2DE4YpMMYT8&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Monroy-Ostria A, Nasereddin A, Monteon V., Guzman-Bracho C, Jaffe C., PCR-RFLP (2014). Diagnosis and Characterization of Leishmania in Clinical Samples and Strains from Cases of Human Cutaneous Leishmaniasis in States of the Mexican Southeast. Recuperado el 20 de enero de 2016 de http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2014.219.01.0042.01.ENG
- Morrison, A., Ferro, C. y Tesh, R. (1993). Host preferences of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. The American journal of tropical medicine and hygiene, 49(1), 68-75.

- Nery, L., Lorosa N. y Franco A. (2004). Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. sp.athotrichia* (diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an urban forest patch in the city of Manaus, Amazonas. Recuperado el 5 de marzo de 2016 de <http://memorias.ioc.fiocruz.br/component/k2/item/1967-feeding-preference-of-the-sand-flies-lutzomyia-umbratilis-and-l-spathotrichia-diptera-psychodidae-phlebotominae-in-an-urban-forest-patch-in-the-city-of-manaus-amazonas-brazil>.
- Ngo, K. y Kramer, L. (2003). Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. *Journal of Medical Entomology*. Recuperado el 27 de diciembre de 2015 de <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-40.2.215>.
- Nicolas, L., Prina, E., Lang, T. y Milon, G. (2002). Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mousse Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*. Recuperado el 5 de noviembre de 2015 de <http://jcm.asm.org/content/40/5/1666>.
- Nieves, E., Oraá, L., Rondón, Y., Sánchez, M., Sánchez, Y., Rujano, M., et al. (2014). Riesgo de transmisión de *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Mérida Venezuela. *Avances en Biomedicina*, 3(2), 57-64.
- Oliveira, A., Marassá, A., Consales, C., Dorval M., Fernandes C., de Oliveira G., Brazil R. y Galati E. (2008). Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul. Recuperado el 29 de Junio de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18611387>
- Ofelia, C., Vargas Franklin, Hashiguchi Yoshihisa, Kato Hirotomoy Eduardo, G. (2011). Identificación de especies *Leishmania* en pacientes y flebotominos en áreas de transmisión en una región del Perú. Recuperado el 11 de Junio de 2015 de http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342011000300007

- OMS. (2010). Informe de una reunión de Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis. Ginebra. Recuperado el 28 de junio de 2016 de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/82766/1/WHO_TRS_949_spa.pdf
- OPS, O.p.d.I.S.y OMS, O.m.d.I.s. (2015). Leishmaniasis: Epidemiological report of the Americas Report Leishmaniasis. Recuperado el 30 de junio de 2016 de www.paho.org/hq/?lang=es
- Organización Mundial de la Salud, O (s.f.). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis WHO technical report series. Geneva: World Health Organization. Recuperado el 2 de julio de 2016 de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf
- Organización Mundial de la Salud, O (s.f.). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases (D. o. C. o. N. T. Diseases, Trans.). In C. David (Ed.), Neglected Diseases (pp. 153). France: World Health Organization. Recuperado el 27 de Junio de 2016 de https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi3upHG1J7QAhUS1GMKHS1zBfYQFggfMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.who.int%2Firis%2Fbitstream%2F10665%2F77950%2F1%2F9789241564540_eng.pdf&usg=AFQjCNHORM9556dgVrPPoLHd19IJ81rSfw&sig2=HARMnGaVJsYe-vLONMiMfQ
- Oshaghi, M., Chavshin, A., Vatandoost, H., Yaaghoobi, F., Mohtarami, F., Hashemzadeh, M., et al. (2005). Effects of Post Ingestion and Physical Conditions on PCR Amplification of Host Blood Meal DNA in Mosquitoes. Iranian J Publ Health. Recuperado el 18 de mayo de 2016 de https://www.researchgate.net/publication/7406924_Effects_of_postin

gestion_and_physical_conditions_on_PCR_amplification_of_host_blood_meal_DNA_in_mosquitoes.

- Palacios, E. (2015). Identificación Molecular de las Preferencias Tróficas de flebótomos colectados en 5 provincias ecuatorianas. Tesis de grado. Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. Universidad San Francisco de Quito. 70pp.
- Palacios, J. y Ontaneda, G. (2013). Boletín Climatológico Anual Año 2012 (D. d. G. Meteorológica, Trans.) Estudios e Investigaciones Meteorológicas: Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. Recuperado el 19 de Agosto de 2015 www.serviciometeorologico.gob.ec
- Perez, J., Virgen, A., Rojas, J., Rebollar-Tellez, E., Alfredo, C., Infante, F., et al. (2014). species composition and seasonal abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coffee agroecosystems. Mem Inst Oswaldo Cruz. Recuperado el 22 de mayo de 2016 <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v109n1/0074-0276-mioc-0074-0276130224.pdf>.
- Ready, P. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. Recuperado el 3 de mayo de 2015 de <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ento-120811-153557>.
- Roqueline A., Aversi-Ferreira, Jucimária Dantas Galvão, Sylla Figueredo da Silva, Giovanna Felipe Cavalcante, Ediana Vasconcelos da Silva, Naina Bhatia-Dey and Tales Alexandre Aversi-Ferreira (2014). Geographical and Environmental Variables of Leishmaniasis Transmission, Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment. Recuperado el 5 de mayo de 2016 de <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/46248.pdf>.
- Salomón, O. (2009). Vectores de Leishmaniasis en las Américas. Recuperado el 7 de agosto de 2015 de <http://www.gmbahia.ufba.br/ojs/index.php/gmbahia/article/viewFile/1024/1000>.

- Sant'Ann, M., Diaz-Albiter, H., Aguiar-Martins, K., Al Salem, W., Cavalcante, R., Dillon, V., et al. (2014). Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. *Parasit Vectors*. Recuperado el 10 de marzo de 2016 de <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-329>.
- Sant'Anna, M., Jones, N., Hindley, J., Mendes-Sousa, A., Dillon, R., Cavalcante, R., et al. (2008). Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. Recuperado el 24 de mayo de 2015 de [http://www.research.lancs.ac.uk/portal/en/publications/blood-meal-identification-and-parasite-detection-in-laboratoryfed-and-fieldcaptured-lutzomyia-longipalpis-by-pcr-using-fta-databasing-paper\(8c288c20-206b-4a6f-8c68-c9bfb2d94d48\)/export.html](http://www.research.lancs.ac.uk/portal/en/publications/blood-meal-identification-and-parasite-detection-in-laboratoryfed-and-fieldcaptured-lutzomyia-longipalpis-by-pcr-using-fta-databasing-paper(8c288c20-206b-4a6f-8c68-c9bfb2d94d48)/export.html)
- Saude. (s.f.). Brasil registra 3 mil novos casos de leishmaniose por año. Recuperado el 18 de julio de 2016 de <http://www.isaude.net/pt-BR/noticia/34917/saude-publica/---brasil-registra-3-mil-novos-casos-de-leishmaniose-por-ano>
- Svobodová M, Alten B, Zídková L, Dvůrák V, Hlavacková J, Mysková J, Seblová V, Kasap O., Belen A, Votýpka J, Volf, P. (2009). Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. Recuperado el 20 de febrero de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18761342>.
- Tesh R., Chaniotis B., Aronson M. y Johnson K. (1971). Natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. Recuperado el 25 de mayo de 2015 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5567741>.
- Tesh R., Chaniotis B., Carrera B. y Johnson K. (1972). Further studies on the natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies. Recuperado el 3 de Junio de 2016 de <http://aje.oxfordjournals.org/content/95/1/88>

- Uribarren, T. Leishmaniosis o Leishmaniasis. Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Autónoma de México. 2015. Recuperado el 18 de junio de 2016 de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html>
- Valderrama, A., Tavares, M., Dilermando, J. y Andrade, J. (2011). Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama. Mem Inst Oswaldo Cruz. Recuperado el 6 de mayo de 2016 de <http://www.pubfacts.com/detail/22241128/Anthropogenic-influence-on-the-distribution-abundance-and-diversity-of-sandfly-species-Diptera-Phleb>
- 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). Gainesville, Florida, USA: Associated Publishers.
- Zapata, S., Mejia, L., Le Pont, F., Leon, R., Pesson, B., Ravel, C., et al. (2012). A study of a population of Nyssomyia trapidoi (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador. Recuperado el 25 de febrero de 2015 de <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-144>.
- Zaveri, N., Green C. y Toll, L. (2000). Transcriptional regulation of the human prepronociceptin gene. Biochemical and Biophysical Research Communications 276: 710-717.
- Zaveri, N, Green, C., Polgar W., Huynh N. y Toll L. (2002). Regulation of transcription of the human prepronociceptin gene by sp.1x. Gene 290: 45-52.
- Zaveri N. y Waleh, T. (2006). Regulation of the prepronociceptin gene and its effect on neuronal differentiation. Gene 384: 27-36.

ANEXOS

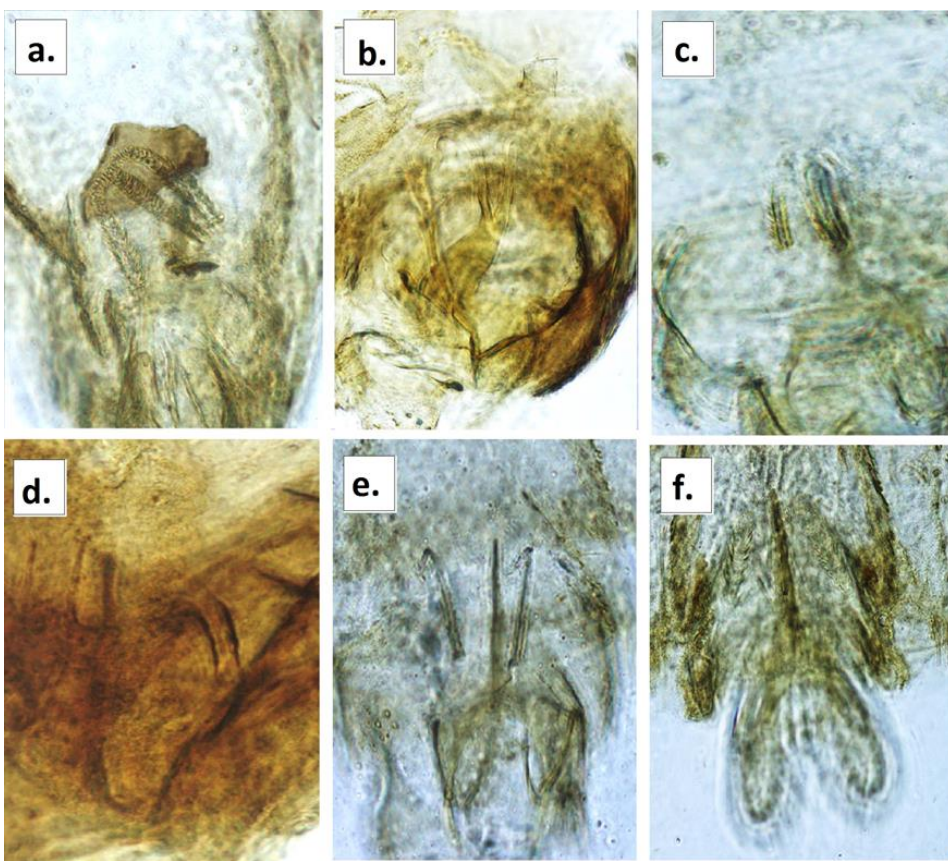
centrado en la hoja,
letra 16

ANEXO 1: Leishmaniasis cutánea



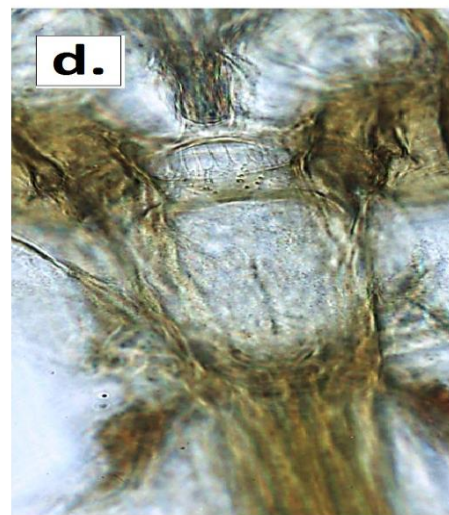
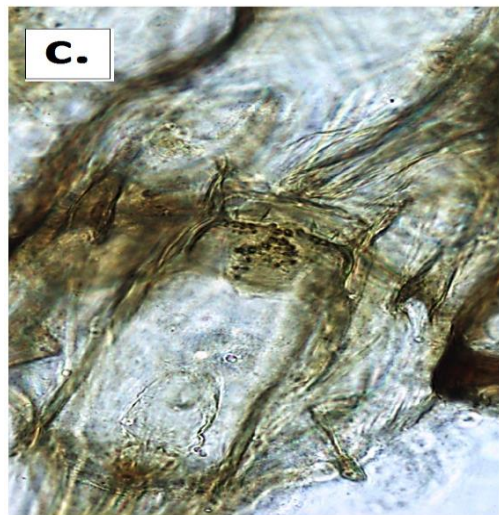
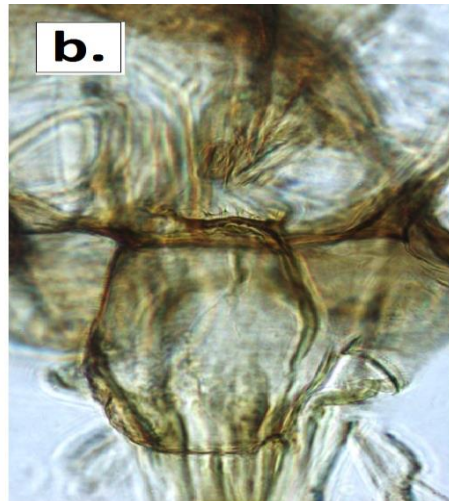
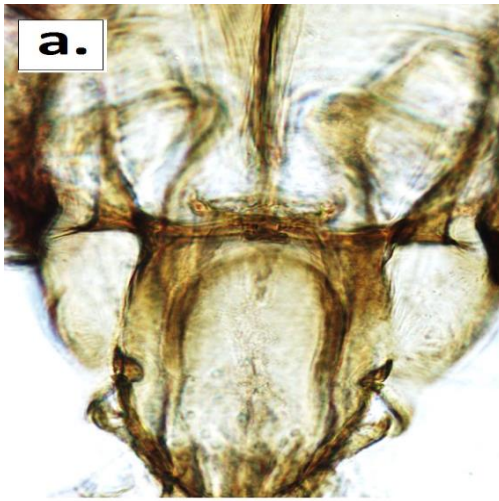
Tomado de: (Moonbattery, s.f.)

ANEXO 2: Leishmaniasis muco-cutánea



Tomado de: ULA VE, s.f.

Anexo 3: Cibarios de los flebótomos colectados



- a) Cibario de *Pressatia* sp.
- b) Cibario de *Lutzomyia camposi*
- c) Cibario de *Psychodopygus carrerai carrerai*
- d) Cibario de *Nyssomyia yuilli yuilli*
- e) Espermateca de *Nyssomyia yuilli yuilli*
- f) Espermateca de *Psychodopygus panamensis*

Anexo 4. Abreviaturas

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