

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**“Identificación molecular de fuentes de alimentación
sanguíneas de flebótomos (Díptera:Psychodidae) de tres
localidades del Ecuador y notas sobre su comportamiento”**

Proyecto de Investigación

David Alonso Guevara Luzuriaga

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de ingeniería en procesos biotecnológicos

Quito, 7 de enero de 2019

**Universidad San Francisco de Quito USFQ
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**“Identificación molecular de fuentes de alimentación sanguíneas de
flebotomos (Diptera:Psychodidae) de tres localidades del Ecuador y
notas sobre su comportamiento”**

David Alonso Guevara Luzuriaga

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Renato León, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 7 de enero de 2019

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: David Alonso Guevara Luzuriaga

Código: 00100292

Cédula de Identidad: 1716932981

Lugar y fecha: Quito, 7 de enero de 2019

Dedicatoria

A mi esposa Madeleyne que con su amor y apoyo incondicional ha sido mi acompañante ideal durante los últimos años de mi carrera y que con su temple y dedicación ha sido capaz de impulsarme y motivarme durante momentos difíciles de mi vida.

A mis padres Jaime y Loly quienes, con los buenos valores, el amor y su alma emprendedora han podido formar una familia amorosa y unida, a la vez que han sido capaces de demostrar a sus allegados que con trabajo duro e ideas claras los sueños se pueden ir construyendo poco a poco mientras ayudas a las personas que están a tu lado. Y por la gran cantidad de consejos y enseñanzas que me han dado durante la vida y que me han servido para llevar una buena vida con principios y valores.

Agradecimientos

A toda mi familia y amigos por estar siempre a mi lado durante la época en que realicé mis estudios universitarios, y por todas las alegrías que me han regalado durante esta hermosa etapa.

A Renato León por la oportunidad que me brindó para realizar mi trabajo de titulación bajo su dirección y por todos los consejos y comentarios realizados para poder terminarla de la mejor manera posible.

A Andrés Carrasco por su amistad y sobre todo por el apoyo, colaboración y orientación precisa en el ámbito de biología molecular y taxonomía que me tocó realizar en mi trabajo de titulación

A la Universidad San Francisco de Quito y al Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical, por haberme dado la apertura para realizar mi trabajo de titulación en sus instalaciones, así como los recursos económicos para desarrollarlo.

RESUMEN

Los flebótomos son Dípteros Nematóceros de importancia médica, ya que son vectores de varias enfermedades parasitarias y arbovirales, siendo las más importantes, la leishmaniasis producida por el parásito del género *Leishmania* y la Bartonelosis, producida por la bacteria *Bartonella bacilliformis*, endémica en el sur del Ecuador y norte del Perú. Anualmente, se reporta en riesgo de transmisión de leishmaniasis a 350 millones de personas en 88 países a nivel mundial. En el Ecuador, esta enfermedad ha sido reportada en 23/24 provincias. El presente estudio determina las preferencias tróficas (fuentes de alimentación sanguínea) de flebótomos hembras colectadas en las localidades de Bucay, Zumba y Damas situadas respectivamente en las provincias de Guayas, Zamora Chinchipe y El Oro. Además, analiza su antropofilia y aporta con observaciones de su comportamiento y adaptación de las especies colectadas a condiciones antropogénicas. Para el estudio, se separaron las hembras de flebótomos alimentadas de sangre y se montaron en placa los últimos segmentos abdominales, cabeza, tórax y alas para identificar las especies; el abdomen se usó para extracción del ADN de la fuente sanguínea, realizar PCR convencional y mediante el secuenciamiento del gen del citocromo B mitocondrial (CYTB), determinar las fuentes sanguíneas de alimentación. Se analizaron 25 especímenes pertenecientes a 7 especies diferentes. El 84% de los individuos analizados se alimentaron de seres humanos tanto en zonas fragmentadas de bosque como en el intra y peridomicilio, mientras que el 16% restante se alimentó de *Gallus gallus*. *Lutzomyia trapidoi* que ha sido incriminado como vector principal de leishmaniasis cutánea en la Costa Pacífica del Ecuador fue encontrado alimentado de sangre en todas las localidades estudiadas de la costa pacífica y esta especie no se encontró en Zumba hacia la Amazonía. Se determinó que casi todos los individuos encontrados se habían alimentado de sangre humana tanto en bosque como en los domicilios, lo que confirma su antropofilia y preferencia por alimentarse del hombre. También se encontraron alimentadas de sangre sea del hombre o de gallina a *Lutzomyia amazonensis*, *Lutzomyia hartmanni*, *Lutzomyia carrerai*, *Lutzomyia hirsuta* y *Lutzomyia serrana* en las localidades de la costa. En la localidad de Zumba hacia la región amazónica, se encontró alimentada únicamente a *Lutzomyia robusta* en su mayoría de sangre humana, en el peridomicilio de varias viviendas. Las muestras fueron examinadas para infección por *Leishmania* usando un Nested PCR y el gen mitocondrial del Citocromo B, sin embargo, no se encontraron individuos infectados.

Palabras clave: Flebótomos, *Leishmania*, *Bartonella bacilliformis*, Damas, Bucay, Zumba, intradomicilio, peridomicilio, zonas fragmentadas, antropofilia, *Homo sapiens*, *Gallus gallus*.

ABSTRACT

The sand flies are Nematoceros Dipterans of medical importance, which are vectors of several parasitic and arboviral diseases, being the most important, the leishmaniasis, produced by the parasite of the genus *Leishmania*, and bartonellosis, caused by the bacteria *Bartonella bacilliformis*, which is endemic in Southern Ecuador and Northern Peru. Annually, approximately 350 million people in 88 countries worldwide are at risk of transmission of leishmaniasis. In Ecuador, this disease has been reported in 23/24 provinces. The current study molecularly identifies the trophic preferences (sources of blood meals) of sand flies collected in the localities of Bucay, Zumba and Damas, respectively located in the provinces of Guayas, Zamora Chinchipe and El Oro. In addition, it analyzes the anthropophilic behavior and addresses the adaptation of the collected species to anthropogenic conditions. For this study, following field sand fly collections, female specimens engorged with blood were sorted out, dissected and the heads, thorax and wings mounted on glass slides in order to identify the species; the abdomens were used for DNA extraction, followed by conventional PCR and sequencing of the mitochondrial cytochrome B (CYTB) gene, to identify the source of the blood meal. 25 specimens belonging to 7 different species were analyzed, 84% of the individuals collected from fragmented forested areas were found that fed from humans in both intra and peridomestic environments, while the remaining 16% fed from *Gallus gallus*. *Lutzomyia trapidoi* has been incriminated as the main vector of cutaneous leishmaniasis in the Pacific Coast of Ecuador and in this study, has been collected in all the studied locations of the Pacific coast, however, was not found in Zumba, the locality at the Amazonian region. Almost all of the individuals collected from this species were found blood fed from *Homo sapiens* which confirms its anthropophilic behavior and preference for feeding on human. In addition, other species that blood fed from humans or chickens were *Lutzomyia amazonensis*, *Lutzomyia hartmanni*, *Lutzomyia carrerai*, *Lutzomyia hirsuta* and *Lutzomyia serrana* at the localities from the coast. In Zumba located toward the Amazon basin, the only species that was found engorged was *Lutzomyia robusta* which fed mostly on humans in peridomestic environments close to human dwellings. The samples were also examined for *Leishmania* infection using a nested PCR and the mitochondrial gene of Cytochrome B, however, none of the samples were found infected.

Key words: Sandflies, *Leishmania*, *Bartonella bacilliformis*, Damas, Bucay, Zumba, intradomicile, peridomicile, fragmented zones, anthropophilic, *Homo sapiens*, *Gallus gallus*.

1 TABLA DE CONTENIDO

Resumen	6
Abstract	7
1 INTRODUCCIÓN	12
1.1 Generalidades.....	12
1.1.1 Flebótomos.....	12
1.1.2 Ciclo de Vida	12
1.1.3 Distribución y Taxonomía	14
1.2 Desempeño como vector	15
1.2.1 Ciclo Extrínseco de Incubación de la <i>Leishmania</i>	17
1.3 Aspectos en el Ecuador.	18
1.3.1 Incriminación de especies de flebótomos como vectores.....	18
1.3.2 Fuentes de Alimentación del Vector.....	19
1.4 Detección de las fuentes sanguíneas y su importancia	20
2 OBJETIVOS	21
2.1 General.....	21
2.2 Específicos	21
3 JUSTIFICACIÓN.....	22
4 ÁREA DE ESTUDIO	23
5 MATERIALES	23
5.1 Colectas Entomológicas.....	23
5.2 Identificación Taxonómica	24
5.3 Extracción de ADN	25
5.4 Cuantificación de ADN	26
5.5 Amplificación de ADN	26
5.5.1 Kit Platinum	26
5.5.2 Kit Flexi Promega	26
5.5.3 Primers	27
5.6 Materiales y Equipos.....	27
5.7 Electroforesis en Gel de agarosa	27
5.8 Secuenciamiento.....	28
6 MÉTODOS.....	28
6.1 Sitios de muestreos.....	28
6.2 Tomas de muestras	28
6.3 Separación de muestras	29
6.4 Montajes	30
6.5 Identificación Taxonómica	31
6.6 Biología molecular	31
6.6.1 Extracción de ADN	31
6.6.2 Cuantificación de ADN.....	32
6.6.3 Amplificación del gen del citocromo b mitocondrial (cyt-b) para detección de fuentes sanguíneas.....	33
6.6.4 Detección de <i>Leishmania</i> amplificando el gen mitocondrial del citocromo B.....	33
6.6.5 Electroforesis en gel de agarosa	34
6.6.6 Secuenciamiento y análisis de secuencias.....	35
7 LIMITACIONES	35

8	RESULTADOS	36
8.1	Colección de especímenes de flebótomos	36
8.2	Análisis taxonómicos de especímenes	37
8.3	Biología Molecular	38
8.3.1	Cuantificación de ADN	38
8.3.2	Amplificación y secuenciación	38
8.3.3	Determinación de las fuentes sanguíneas de alimentación amplificando el gen CYTB. 38	
8.3.4	Tendencias tróficas de las especies encontradas alimentadas con sangre.	39
8.3.5	Detección de <i>Leishmania</i> con Nested PCR.	40
9	DISCUSIÓN	40
9.1	Especímenes colectados	40
9.2	Determinación de las fuentes sanguíneas de alimentación	43
9.3	Análisis Molecular	46
9.4	Detección de <i>Leishmania</i> con Nested PCR.	48
10	CONCLUSIONES	48
11	RECOMENDACIONES	49
12	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
13	TABLAS	56
14	FIGURAS	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Protocolo de Amplificación del gen mitocondrial CYTB.....	56
Tabla 2.- Programa del termociclador.....	56
Tabla 3.- Muestra los resultados del blast de las secuencias obtenidas tras la amplificación del gen del citocromo b mitocondrial.	57
Tabla 4.- Muestra el resumen de los resultados obtenidos.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 .- Mapa del Ecuador donde se señala las localidades de colección.....	59
Figura 2.- Foto del intradomicilio de una vivienda donde se hicieron colectas.	59
Figura 3.- Foto del peridomicilio de una vivienda en donde se hicieron colectas.....	60
Figura 4.- Trampa mosquito magnet usada durante las colectas en campo.....	60
Figura 5.- Trampa CDC usada durante las colectas en campo.	61
Figura 6.- Partes de flebótomos para identificación taxonómica.....	61
Figura 7.- Muestra de un montaje en placa de las estructuras de un flebótomo listo para su reconocimiento usando microscopio.	62
Figura 8.- Cantidad total de especímenes colectados.	62
Figura 9.- Total de flebótomos hembras y machos colectados.....	63
Figura 10.- Total de flebotomos hembras y machos colectados por localidad.....	63
Figura 11.- Total de hembras alimentadas que fueron colectadas equivale al 1,65% del total de hembras colectadas.	64
Figura 12.- Flebótomos hembras alimentadas que fueron colectadas en cada localidad.	64
Figura 13.- Muestra el porcentaje de especímenes analizados que se alimentaron de cada una de las fuentes de sangre encontradas en el estudio.	65
Figura 14.- Fuentes de Alimentación de cada una de las especies de flebótomos alimentados.	65
Figura 15.- Muestra la cantidad de especímenes de flebótomos de cada especie colectados ya sea en el intradomicilio, peridomicilio o bosque secundario.	66
Figura 16.- Gel que muestra las bandas positivas de la amplificación del gen cvtb.	67

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

1.1.1 Flebótomos

Los flebótomos son Dípteros Nematóceros de entre 2 a 3 mm de longitud. Tienen ojos prominentes, patas largas y alas lanceoladas que se encuentran cubiertas por abundantes microvellosidades al igual que el resto del cuerpo. Al posar sobre sus patas, los flebótomos paran sus pequeñas alas en ángulo en forma de “V” y se les conoce vulgarmente como “manta blanca” por su tendencia a llegar en grupo, así como su apariencia blanquecina. Su color es siempre claro con tonalidades más oscuras en ciertas especies especialmente en el pronoto. Poseen un dimorfismo sexual marcado, ya que los machos a diferencia de las hembras tienen una modificación en los últimos segmentos del abdomen que forman su genitalia externa que sirve para sostener a la hembra durante el periodo de copulación (Lucientes et al, 2005). Se los conoce como insectos telmófagos ya que al cortar la piel rompen los capilares lo que produce charcos de sangre, de los cuales los flebótomos se alimentan directamente por succión. Durante este proceso, también cortan terminaciones nerviosas lo que provoca que se genere el dolor característico de las picaduras de estos conocidos insectos (Annex, 2015).

1.1.2 Ciclo de Vida

Los flebótomos poseen 4 estadios en su ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto. Son insectos con metamorfosis completa u holometábolos (Lucientes et al, 2005). Al principio del ciclo de vida, una vez que la hembra deposita los huevos (ovoposición), éstos eclosionan entre los 4 y 20 días, sin embargo, se ha encontrado que

en climas fríos el tiempo de incubación puede durar más. Los huevos tienen una forma elíptica, coloración oscura y con patrones en el cascarón típicos de cada especie. La hembra deposita los huevos en pequeños agujeros, al suelo en o cerca de la base de los árboles, en las grietas de las piedras y en microhábitats similares (Young et al, 1994). Las hembras pueden ovopositar entre 40 a 70 huevos dependiendo de las especies, su tamaño, otros factores en la naturaleza y sobre todo de la fuente sanguínea de la que se alimentaron (Annex, 2015).

El estado larvario incluye 4 fases y se completa después de 20 a 30 días, dependiendo de la especie, la disponibilidad de los nutrientes para su alimentación y los factores climáticos, siendo el más importante la temperatura (Lewis, 1971). Los cambios bruscos en el medioambiente como bajas o altas temperaturas, e incluso período de sequía bien marcados hacen que las etapas larvarias puedan extenderse incluso por meses. Durante estas etapas los flebótomos tienen un aspecto vermiforme y alcanzan una longitud de máximo 12 mm. Las pequeñas larvas se alimentan de materia orgánica haciendo uso de un aparato bucal masticador que desarrollan durante este periodo (Young et al, 1994).

Una vez terminados los estadios larvarios, buscan un lugar seco, normalmente hojas secas o piedras, que utilizan para empupar. En el estadio de pupa no se alimentan y dura de 6 a 13 días, hasta que emergen como flebótomos adultos. Después de 24 horas de haber emergido de la pupa, los machos giran su genitalia 180° y alcanzan la madurez sexual. Posteriormente los machos adultos serán atraídos por las hembras mediante feromonas para iniciar el cortejo que terminara con la reproducción. Esto ocasionalmente ocurre sobre un hospedador del que la hembra se alimenta una vez terminada la cópula o durante la misma (Young et al, 1994). La sangre del hospedador aporta con las proteínas necesarias para la formación y maduración de los huevos

(Noguera et al, 2006). Se ha visto que ciertas fuentes de sangre son más nutritivas que otras y de esto depende directamente la cantidad de huevos que se desarrollan en la hembra y su tasa de fecundidad (Nieves et al, 2011).

1.1.3 Distribución y Taxonomía

Los flebótomos habitan en regiones tropicales y subtropicales, así como en otras zonas calientes; sin embargo, varios estudios han reportado su presencia hasta en 50° de latitud Norte en las afueras de París o incluso en Kamloops en Canadá. Están distribuidos en muchas regiones del planeta, pero que su mayor limitación es la temperatura. En el Viejo Mundo, se los puede encontrar en ciertas zonas del mediterráneo, en algunos países de Asia Central y en las subzonas de la región Paleártica, así como al este, norte y oeste de la región etíope. Están dispersos tanto en bosques como en las sabanas, estepas, desiertos y se han encontrado a una altura máxima de 1000 metros sobre el nivel del mar. En el Nuevo Mundo abundan en todos los países desde el sur de Canadá hasta el norte de Argentina sobre todo en los bosques húmedos en donde se pueden encontrar especies que se alimentan del ser humano sobre todo en las épocas lluviosas y calientes, pero también están presentes en zonas semiáridas y hasta una altura de 2800 metros sobre el nivel del mar en la cordillera de los Andes (Lewis, 1971).

En la actualidad, existen más de 1000 especies reconocidas de flebótomos alrededor del mundo, de las cuales 530 se encuentran en el Nuevo Mundo y 470 en el Viejo Mundo. Los flebótomos pertenecen al orden Díptera, suborden Nematóceras, familia Psychodidae y subfamilia Phlebotominae (Akhoundi et al, 2016). Históricamente, estos han sido clasificados según las características morfológicas y se reconocen dos periodos en referencia a su taxonomía. En el primer periodo los taxos

eran formados tras analizar las estructuras externas como la genitalia de los machos, ciertos índices de las venas de las alas y otras medidas externas conocidas anteriormente como Flebometría. Durante el segundo período se empleó las descripciones de estructuras internas como la espermateca, el cibario y la faringe. Fue Lewis et al, (1977) quien propuso por primera vez la clasificación de los flebótomos del viejo mundo en dos géneros (*Phlebotomus* y *Sergentomya*) y las del nuevo mundo en tres géneros (*Lutzomyia*, *Brumptomya* y *Warileya*). A esta clasificación se le agregó el género *Chinius* en el viejo mundo para incluir ciertas especies de flebótomos que habitan en China y que presentan características ancestrales. Esta clasificación fue posteriormente revisada por Young and Duncan y ha sido extensamente utilizada por los taxónomos a nivel mundial (Akhoundi et al, 2016)

En el Brasil, hacia los años 90s se propuso un nuevo sistema de clasificación que eleva los subgéneros a géneros y reconoce a 464 especies de flebotominos del neotrópico, agrupados en 23 géneros, 20 subgéneros, tres grupos de especies y 28 series propuesto por Eunice Galati en 1995 y es en la actualidad la clasificación más aceptada y usada a nivel mundial.

1.2 Desempeño como vector

Los flebótomos han sido incriminados como vectores de varios patógenos sobre todo del parásito protista del género *Leishmania* que se transmite por la picadura de las hembras de flebótomos infectadas y produce síntomas que varían desde el apareamiento de úlceras cutáneas (Leishmaniasis Cutánea o Tegumentaria) hasta afectación de órganos (bazo, hígado y otros) en formas más complicadas de la enfermedad (Leishmaniasis visceral) (OMS,2015).

Estos también transmiten otros patógenos a los humanos como por ejemplo varios arbovirus y la bacteria *Bartonella bacilliformis* causante de bartonellosis (Maroli et al,

2013). Entre los virus que transmiten están los del género Phlebovirus (la fiebre del flebótomo, meningitis de verano, encefalitis), Vesiculovirus (enfermedad de estomatitis vesicular) (Maroli et al, 2013) y otros virus como Chandipura y Changuinola (Depaquit et al, 2010). Recientemente se los encontró infectados aquí en Ecuador con un nuevo virus, el primer Flavivirus encontrado en este grupo al que se le llamo virus Paraiso Escondido (Alkan et al, 2015).

Las tres fases clínicas más importantes de la leishmaniasis, son la leishmaniasis cutánea (LC), la leishmaniasis mucocutánea (LMC) y la leishmaniasis visceral (LV). La leishmaniasis cutánea (LC) se manifiesta en el área en donde se alimentó el flebótomo, casi siempre se cura por si sola después de un tiempo y se presenta como úlceras en la zona de la picadura, la leishmaniasis mucocutánea (LMC) se caracteriza por la destrucción de las mucosas y del tejido adyacente, mientras que la leishmaniasis visceral es más bien una infección sistémica que hay que tratar con medicamento que afecta principalmente al hígado, bazo y médula ósea. Se estima que la leishmaniasis cutánea (LC) afecta a entre 1-1,5 millones de personas cada año en todo el mundo y la leishmaniasis visceral (LV) a 0,5 millones de personas (Desjeux, 2004).

Las otras enfermedades transmitidas por lo flebótomos son menos comunes, ya que la bartonelosis transmitida por flebótomos y causante de la enfermedad de Carrión solo se ha encontrado en Perú, en ciertas zonas del Ecuador y durante una temporada en los años 40 del siglo pasado se describió en Colombia (Young et al, 1994). En cuanto a los flebovirus y vesiculovirus transmitidos por flebótomos, se conoce que estos son mucho menos frecuentes y se encuentran distribuidos en varios países del mundo, su estudio no es muy extenso y por tal razón se sabe muy poco de sus ciclos de infección.

Los flebovirus más conocidos son aquellos que causan la fiebre del flebótomo y la meningitis de verano, estos son el virus de Sicilia y el virus de la toscana

respectivamente. La fiebre del flebótomo se caracteriza por fuertes estados febriles que pueden ocasionar la muerte (Maroli et al, 2013).

Los vesiculovirus transmitidos por los flebótomos son el virus de Chandipura e Isfahan y son los causales de la estomatitis vesicular y de la encefalitis, los síntomas de la primera incluyen la fiebre, mialgia, falta de energía y dolor de cabeza, mientras que la encefalitis se caracteriza por los fuertes estados febriles (Maroli et al, 2013).

Es bien conocido que los flebótomos son en su mayoría insectos nocturnos y crepusculares, que como máximo pueden desplazarse en toda su vida algo más de un kilómetro, pero que la mayoría solo se mueve no más de unos pocos cientos de metros, es por esta razón que la transmisión de las enfermedades sobre todo la leishmaniasis es discontinua en las áreas endémicas y por lo general se da en pequeños focos en lugares cercanos a los hábitats de los reservorios de los que se alimentan las hembras (Lewis, 1971).

1.2.1 Ciclo Extrínseco de Incubación de la *Leishmania*.

El desarrollo de la *Leishmania* dentro del vector comienza cuando las hembras de los flebótomos se alimentan de sangre que contenga macrófagos infectados con amastigotes del parásito (los que se caracterizan por su forma pequeña (3-5 μm) y redonda y que se mantienen inmóviles). El descenso en la temperatura y el aumento del pH que experimenta el parásito cuando pasa del mamífero reservorio al intestino medio del flebótomo, desencadena el desarrollo y la transformación morfológica del parásito dentro del vector. Al principio, los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos (caracterizados por ser poco móviles y por poseer un pequeño flagelo en la parte anterior de la célula), que son las primeras formas replicativas del parásito. Estas junto con la sangre del espécimen del que se alimentó la hembra, son envueltas en el

intestino medio de la hembra por la matriz peritrófica (hecha de proteínas en una matriz de quitina) que es secretada por el epitelio del tubo digestivo de la hembra y trata de contener al parásito. Sin embargo, éste escapa perforando la matriz peritrófica mediante quitinasas producidas por el mismo parásito. Tras 48 a 72 horas, los parásitos disminuyen su velocidad de replicación y se diferencian en promastigotes y nectomonas que son muy móviles y bastante largas. Estas también escapan de la matriz peritrófica que trata de limitar la diseminación del parásito a otras áreas del tubo digestivo. Todas estas formas del parásito migran a la parte anterior del intestino medio y se transforman en pequeños promastigotes metacíclicos (la forma infectante), que posteriormente pasan a la válvula faríngea del vector, para luego continuar su ciclo dentro del reservorio cuando una hembra pica a este hospedero y vuelve a picar a otro hospedero transmitiendo el parásito (Dostálová et al, 2012).

1.3 Aspectos en el Ecuador.

1.3.1 Incriminación de especies de flebótomos como vectores

Se ha incriminado a varias especies de flebótomos con la transmisión de patógenos especialmente *Leishmania* siguiendo los siguientes criterios:

- a) Se alimentan de seres humanos.
- b) Se alimentan también de los animales que son reservorios del parásito
- c) Deben ser infectados en la naturaleza con la misma especie de *Leishmania* que los seres humanos e identificados por el uso de isoenzimas o ADN.
- d) El vector debe permitir el desarrollo completo del parásito después de que la sangre infectada sea totalmente digerida.
- e) El vector es capaz de transmitir el parásito por una mordida mientras toma sangre del hospedero.

De acuerdo con estas consideraciones, se ha reportado que *Lutzomyia trapidoi* y *Lutzomyia gomezi* son vectores incriminados de *Leishmania panamensis* y de *Leishmania guyanensis* en el Ecuador. De la misma manera, *Lutzomyia tortura* ha sido incriminada como vector de *Leishmania (Viannia) naiffi* (Hashiguchi et al, 2017), y *Lutzomyia ayacuchensis* como vector de *Leishmania. (L.) mexicana* (Hashiguchi et al, 2017). De igual manera, *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia olmeca olmeca*, *Lutzomyia olmeca bicolor*, *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia carrerai carrerai*, *Lutzomyia maranonensis*, *Lutzomyia serrana*, *Lutzomyia castanea* y *Lutzomyia hartmanni* han sido reportados como posibles vectores de leishmaniasis en el Ecuador y han sido incriminado como vectores por reportes en otros países (Brazil et al, 2015). Además, se ha reportado también a *Lutzomyia robusta* como vector principal de *Bartonella bacilliformis* en los casos de enfermedad de Carrión reportados en Ecuador (Carrasco, 2017).

1.3.2 Fuentes de Alimentación del Vector.

Las preferencias tróficas de las diferentes especies de flebótomos que han sido reportadas del Ecuador han sido estudiadas muy limitadamente. Se ha visto que ciertos animales silvestres sirven como fuente de alimentación de flebótomos, este es el caso de *Sciurus vulgaris*, *Potos flavus* y *Tamandua tetradactyla* que son considerados como reservorios de *L. amazonensis* en la costa del Ecuador, *Choloepus hoffmanni* considerado como reservorio de *L. panamensis*, *Ratus rattus* como reservorio de *L. (L.) mexicana*. (Hashiguchi et al, 2017). También se ha reportado a los perros (*canis familiaris*), como una fuente importante de alimentación a nivel peridomestico y han sido encontrados infectados sugiriendo su rol como reservorios de *L. panamensis* /

guyanensis y *L. mexicana* tanto en las zonas de la costa ecuatoriana como en la zona andina (Calvopiña et al, 2004).

Otros estudios recientes han encontrado que varias especies de flebótomos que están involucrados en el ciclo de transmisión de la leishmaniasis en Valle hermoso (una de las zonas endémicas de la enfermedad en Ecuador), se alimentan de sangre proveniente de distintos tipos de aves, pero sobre todo de *Gallus gallus* (Anaguano et al, 2015). Se sabe, además, de otro estudio realizado en 5 provincias del Ecuador, en donde se analizaron 50 individuos alimentados, que los flebótomos se alimentaron de *Equus caballus*, *Capra hircus*, *Bos Taurus*, *Pecari tajacu*, *Cebus capucinus*, *Tapirus terrestres* y por supuesto del ser humano (Palacios, 2015).

1.4 Detección de las fuentes sanguíneas y su importancia

La determinación de las fuentes de alimentación de los flebótomos es un tema de interés ampliamente abordado en otros países en donde se han usado distintas técnicas inmunológicas y moleculares para estudiar su comportamiento alimenticio. Dentro de las técnicas inmunológicas está la prueba de la precipitina y el ELISA. Sin embargo, estos métodos presentan ciertas complicaciones como la necesidad de crear anticuerpos específicos para una gran variedad de especies, la posible reactividad cruzada entre las distintas especies, y sobre todo la incapacidad de detectar nuevas especies si no se dispone de anticuerpos específicos para las mismas. (Maleki-Ravasan et al, 2009).

Recientemente, se han desarrollado nuevos métodos moleculares como RFLP, Real time PCR, secuenciamiento de ADN, PCR de grupos específicos, hibridación de line-blot en reversa, análisis heteroduplex y perfil de ADN, los cuales hacen uso de ciertos marcadores genéticos como genes del ARN ribosomal (12S y 16S), genes mitocondriales (Citocromo b, genes del citocromo c oxidasa sub unidad I) e incluso

genes nucleares (PNOC) para determinar las fuentes sanguíneas. Estas técnicas presentan la ventaja de ser mucho más precisas, fáciles de realizar y permiten la identificación de varias especies mediante el análisis de las secuencias y comparación con las secuencias publicadas en GenBank (da silva et al, 2015).

La identificación de las fuentes de sangre aporta en el conocimiento del ciclo de vida y comportamiento de los diferentes patógenos, en la identificación de reservorios de las enfermedades, así como en la capacidad que tienen las diferentes especies de actuar como vectores de agentes de enfermedad (da silva et al, 2015) y desarrollar estrategias eficaces para controlar y/o evitar la propagación dentro de enfermedades vectoriales en la población humana (Abbasi et al, 2009). Finalmente, permite también conocer que animales pueden servir para el desarrollo de potenciales medios de cultivo del parásito *Leishmania*, o para el desarrollo del parásito en infecciones controladas en el laboratorio (Baum et al, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 General

- Identificar las fuentes sanguíneas de alimentación de flebótomos (Diptera:Psychodidae) capturados en varias localidades del Ecuador.

2.2 Específicos

- Determinar las distintas especies de flebótomos con comportamiento antropofílico.
- Comparar las secuencias de ácidos nucleicos obtenidas del gen CYTB con publicaciones de secuencias en GenBank.

- Hacer anotaciones sobre las especies de flebótomos, su comportamiento y su posible rol como vectores en los lugares muestreados.

3 JUSTIFICACIÓN

Los flebótomos (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) son los únicos vectores conocidos de Leishmaniasis, una enfermedad desatendida y prioridad para la Organización Mundial de la Salud, que cada año pone en riesgo a más de 350 millones de personas. En las Américas, son miles de personas infectadas cada año; el diagnóstico es complicado al igual que el tratamiento que generalmente es prolongado y puede tener complicaciones por su nivel de toxicidad o por resistencia del parásito al mismo (Desjeux, 2004), lo que en conjunto hace que esta dolencia sea de preocupación para los sistemas de salud y para las comunidades en zonas endémicas. La epidemiología de la leishmaniasis aún no es completamente conocida y la información de las especies de parásitos que circulan en zonas endémicas y los detalles de sus ciclos naturales generalmente es incompleta. Aunque varias especies de flebótomos han sido incriminadas como vectores, poco se conoce de las preferencias tróficas de las mismas (Kato et al, 2005).

Conocer de qué animales se están alimentando los flebótomos, puede ayudar a identificar aquellas especies capaces de transmitir enfermedades, el nivel de riesgo que corre una población dentro de determinada zona, el nivel de exposición a los vectores y los posibles reservorios que son fundamentales en la diseminación de las enfermedades sobre todo la leishmaniasis (Baum et al, 2015). Adicionalmente, en la actualidad, gran cantidad de áreas en zonas tropicales y subtropicales de las Américas están siendo sometidas a cambios por la intervención del ser humano, explotación petrolera, minería,

colonización y deforestación, lo que ha provocado que muchas especies de flebótomos pasen por procesos de adaptación a condiciones antropogénicas y nuevas especies de flebótomos se adapten a los cambios que están ocurriendo y representen mayor riesgo al adquirir un posible rol como vectores de enfermedades (Rosario et al, 2016). En esta dinámica constante de los ciclos selváticos de estos parásitos que involucra directamente a sus vectores, un constante monitoreo de estas especies y su comportamiento aporta en el conocimiento de la epidemiología de esta enfermedad y en la información de los ciclos naturales de las diversas especies de *Leishmania* que han sido reportadas del Ecuador. También ayuda a las autoridades de salud a tener un mejor manejo de la enfermedad y a implementar estrategias más adecuadas de prevención y control de la transmisión (OMS, 2010).

4 ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se realizó en 3 localidades del Ecuador. La localidad de Damas cerca de la población de Santa Rosa en la provincia de El Oro, las zonas aledañas a la población de Zumba en Zamora Chinchipe y la localidad de Bucay en la provincia del Guayas. En Damas y en Bucay, se han registrado casos de Leishmaniasis en años pasados, y en Zumba se han reportado casos de Leishmaniasis y Bartonelosis en el pasado. Las colectas se realizaron entre el 2016 y el 2017, en la época de verano (Ver figura 1).

5 MATERIALES

5.1 Colectas Entomológicas

Durante las colectas se utilizaron los siguientes materiales:

- Trampa Mosquito Magnet.
- Cilindro de Gas para la trampa mosquito Magnet.
- Estructura del mosquito Magnet.
- Trampas de luz CDC.
- Mallas entomológicas para las trampas CDC.
- Techos para las trampas CDC.
- Baterías de 6 V para las trampas CDC.
- Ligas para asegurar las mallas entomológicas.
- Cargador de las baterías de 6 V.
- Estereoscopio.
- Cajas Petri.
- Lupa.
- GPS
- Pinzas.
- Frascos para almacenar las colectas entomológicas.
- Etanol al 70%.
- Tubos de Ensayo.

5.2 Identificación Taxonómica

Para la identificación Taxonómica se utilizaron los siguientes materiales:

- Estereoscopio.
- Microscopio óptico.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml.
- Aguja NIPRO de 0,4 mm x 13 mm.
- Guantes de Látex.
- Etanol al 70%.

- Pinzas Entomológicas.
- Cajas Petri.
- Pipetas Pasteur.
- Solución Marc André.
- Jeringas de 1ml.
- Placas Portaobjetos.
- Placa Cubreobjetos.
- Lactofenol.
- Goma Cloral.
- Euparal.
- Mechero Bunsen.
- Solución Salina.

5.3 Extracción de ADN

El ADN se extrajo usando los siguientes materiales:

- DNeasy Blood & Tissue Mini Spin Column Kit (Qiagen).
- Vortex.
- Microcentrífuga.
- Incubadora a 56° C.
- Etanol al 100%.
- Proteinasa k.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml.
- Estereoscopio.
- Micropipetas de 100-1000 μ l y de 20-200 μ l.
- Micropistilos.
- Pinzas Entomológicas.

5.4 Cuantificación de ADN

Para la Cuantificación de ADN se utilizó los siguientes materiales:

- Muestras de ADN.
- Nanodrop 2000 (Termofisher).
- Solución Blanco, Buffer AE 1X.
- Agua destilada ultra pura (Termofisher).
- Micropipeta de 0,5-10 μ l.

5.5 Amplificación de ADN

5.5.1 Kit Platinum

Para la amplificación del ADN con el kit Platinum se usaron los siguientes materiales:

- DNA Template.
- Ultra-Pure Distilled Water (ThermoFischer).
- Primers para CYTB.
- 10X PCR Buffer.
- Platinum Taq Polymerase.
- 50 mM MgCl₂.
- 10 mM dNTPs.

5.5.2 Kit Flexi Promega

Para la amplificación del ADN con el kit Flexi Promega se usaron los siguientes materiales:

- DNA Template.
- Ultra-Pure Distilled Water (ThermoFischer).

- Primers para CYTB.
- 5X PCR Buffer.
- 10uM dNTPs.
- 25 mM MgCl₂.
- Go Taq.

5.5.3 Primers

- CYTB-Forward: CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA
- CYTB-Reverse: GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA
- L.CYT-AS: GCG GAG AGR ARG AAA AGG C
- L.CYT-AR: CCA CTC ATA AAT ATA CTA TA
- L.CYT-S: GGT GTA GGT TTT AGT YTA GG
- L.CYT-R: CTA CAA TAA ACA AAT CAT AAT ATR CAA TT

5.6 Materiales y Equipos

Para la amplificación del gen cytb se utilizaron los siguientes materiales y equipos:

- Termociclador BioRad.
- Tubos Eppendorf de 0,2 ml.
- Micropipetas de 100-1000 µl, 10-100 µl y 0,5-10 µl

5.7 Electroforesis en Gel de agarosa

Para la realización del gel de agarosa se utilizaron los siguientes materiales:

- Amplicones (CYTB-F / CYTB-R).
- Buffer TBE 1X
- SYBER SAFE.
- Cámara de electroforesis (BioRad).

- 6X Blue Orange Dye.
- Fuente de poder.
- Peine.
- Parafilm.
- Balanza.
- Agarosa (Ultra Pure).
- Cables conectores positivo y negativo
- Microondas

5.8 Secuenciamiento

- Amplicones (CYTB-F / CYTB-R).

6 MÉTODOS

6.1 Sitios de muestreos

Se consideraron los siguientes sitios para el muestreo:

- Zonas de bosque secundario, potreros, plantaciones de plátano y cafetales que se encuentren ubicados cerca de viviendas en zonas rurales.
- Casas de madera, gallineros y chancheras construidas con madera, casas de adobe. Se colecta tanto en el intradomicilio como en el peridomicilio (Ver figura 2 y 3).

6.2 Tomas de muestras

En el proceso de colección de cada espécimen analizado en este estudio se utilizaron varios métodos de colecta.

- **Trampa Mosquito Magnet:** Esta es una trampa que en países desarrollados es utilizada para control de insectos y mosquitos en patios y jardines especialmente en época de verano. Consiste en un sistema que mediante una reacción catalítica transforma el gas licuado de petróleo (gas de cocina) en Dióxido de carbono simulando la respiración de un animal que exhala CO₂. Adicionalmente utiliza un atrayente (Lure) que contiene ácido láctico y otros químicos comúnmente encontrados en la piel que se han mostrado son efectivos atrayendo a los insectos hematófagos al aparato los mismos que son absorbidos a una funda colectora por acción de una hélice de absorción. El Mosquito Magnet se operó desde las 7 pm a las 7 am para las colecciones y fue colocado en peridomicilio y zonas de bosque (Ver figura 4)
- **Trampas de luz CDC:** Estas son pequeñas trampas de luz que se ubicaban durante la noche entre la 7 pm y las 7 am a una altura de 0,5 metros del suelo, tanto en el peri e intradomicilio como en el bosque cercano a las casas. Esta trampa posee un foco con luz blanca que atrae a los flebótomos y un ventilador que los absorbe hacia una funda colectora hecha de malla que se acopla en la parte inferior del aparato (Ver figura 5) (Kline et al, 2011).

Después de capturar los especímenes, estos fueron sometidos al frío en una congeladora a -20 °C por aproximadamente 30 minutos para sacrificarlos. Seguidamente, las muestras ya muertas fueron transferidas desde las fundas colectoras a frascos individuales con etanol al 70%, etiquetadas y transportadas al LEMMT USFQ. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio.

6.3 Separación de muestras

Para separar los flebótomos del resto de insectos recolectados por las trampas, se ubicaba todo el contenido de cada uno de los frascos en una caja Petri, y con la ayuda de

un estereoscopio se separaban los flebótomos del resto de insectos. Los flebótomos fueron separados machos de hembras, colocados por separado y almacenados en tubos eppendorf de 1,5 ml con etanol al 70%.

6.4 Montajes

Durante esta investigación únicamente se montaron las hembras alimentadas siguiendo los protocolos que se exponen a continuación:

- **Protocolo 1:** Los individuos seleccionados para el estudio fueron colocados en una placa porta objetos con una gota de etanol al 70%. Usando agujas estériles se separaron la cabeza, las alas y los tres últimos segmentos abdominales, mientras que el resto del cuerpo fue almacenado en tubos eppendorf de 1,5 ml con etanol al 70%, que fueron guardados a -20 °C. para posteriormente extraer su ADN y proceder con las pruebas moleculares.

La cabeza, las alas y los tres últimos segmentos abdominales disectados fueron colocados en una nueva placa portaobjetos con 2 gotas de solución Marc André la cual después de aproximadamente 10 segundos se calentaba con la ayuda de un mechero por unos pocos segundos para clarificar las estructuras taxonómicas del flebótomo. Las estructuras clarificadas eran transferidas a una nueva placa portaobjetos y se añadía una pequeña gota de Goma Cloral para su montaje. Con ayuda de un estereoscopio se verificaba que la cabeza, alas y los tres últimos segmentos abdominales se encuentren en posición correcta. Se terminaba el montaje colocando una placa cubreobjetos, la cual era presionada de manera delicada hasta que las estructuras podían visualizarse claramente en el microscopio (Young et al, 1994).

- **Protocolo 2:** Este método sigue los mismos pasos que el anterior con la diferencia que se usó al principio solución salina, en lugar de etanol al 70% y

lactofenol por 24 horas en lugar de solución de Marc André. Además, la Goma cloral es reemplazada por Euparal y no se usó calor mediante un mechero.

6.5 Identificación Taxonómica

Durante el proceso de identificación taxonómica se usó las claves dicotómicas de Young & Duncan, (1994), las cuales se basan en las distintas características morfológicas tanto externas como internas para identificar las especies de flebótomos (Ver figura 6)

Los montajes de los flebótomos en placa de vidrio se observaron en el microscopio usando el aumento de 40X, con la finalidad de observar las características de la espermateca, el cibario, los palpos, las alas y así poder determinar las especies de flebótomos (Ver figura 7).

6.6 Biología molecular

6.6.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el Kit de Qiagen Dneasy Blood and Tissue Mini Spin Column. En total se realizaron 37 extracciones de ADN de individuos diferentes. Para el proceso de extracción se descartó el etanol al 70% que contenía cada tubo eppendorf y se añadió 180 µl de buffer ATL. Posteriormente, con la ayuda de un pistilo plástico se trituró el cuerpo del flebótomo contenido en el tubo hasta que quedó totalmente disuelto en el buffer ATL. Se puso 20 µl de proteinasa K dentro del tubo y con ayuda de un vortex se agitó su contenido durante 5 segundos con la finalidad de mezclar bien los componentes, para luego darle un spin down e incubarlo a 56 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se agregó 200 µl de buffer, se mezcló mediante un vortex y se sometió a 56 °C por 30 minutos en una incubadora. A continuación, se

colocó 200 µl de etanol al 100% a cada eppendorf y se mezcló con vortex nuevamente. Finalmente, se transfirió todo el contenido de los tubos eppendorf a las columnas DNeasy Mini spin, las cuales fueron colocadas previamente dentro de tubos de colecta de 2 ml incluidos en el kit de extracción.

Las columnas fueron centrifugadas a 8000 rpm por 2 minutos. El líquido que quedó en cada tubo de colecta junto con el tubo de colecta fue descartado y las columnas colocadas en nuevos tubos de colecta. Se añadió 500 µl de Buffer AW1 dentro de las columnas DNeasy Mini spin y se centrifugó nuevamente por 2 minutos a 8000 rpm. Se descartó nuevamente líquido y tubo de colecta como en la primera ocasión y se colocó las columnas en nuevos tubos de colecta. Se añadió 500 µl de buffer AW2 a cada columna y se centrifugaron a 14000 rpm por 5 minutos, hasta que la membrana de las columnas DNeasy Mini spin se secó, se descartó nuevamente líquido y tubos y se colocó las columnas dentro de tubos eppendorfs de 1,5 ml previamente esterilizados. A partir de este punto se colocó 50 µl de buffer AE gota a gota directamente sobre cada columna de las DNeasy Mini spin, se incubó a temperatura ambiente y se centrifugó por 2 minutos a 8000 rpm. Por último, se descartó las columnas DNeasy Mini spin y el ADN eluído que quedo en los tubos eppendorfs de 1,5 ml fue almacenado a -20°C y debidamente rotulado.

6.6.2 Cuantificación de ADN.

Para determinar la concentración y la calidad del ADN extraído, se usó un espectrofotómetro modelo Nanodrop 2000 TM. Para esto se activó el programa y se limpió el lente con agua destilada. A continuación, se puso 2 µl de buffer AE como solución blanco para iniciar las mediciones del ADN, y por último se puso 2 µl de cada

muestra de ADN en el lector el cual registró la concentración de ADN y la relación 260/280 y 230/260 de cada una de las muestras de ADN extraído

6.6.3 Amplificación del gen del citocromo b mitocondrial (cyt-b) para detección de fuentes sanguíneas.

El gen utilizado para determinar las fuentes de alimentación sanguíneas fue el gen del citocromo b mitocondrial (CYTB) que tiene una longitud de 358 pb (Pérez, 2017). Las secuencias de los primers usados para amplificar este gen fueron:

CYTB-Forward: CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA

CYTB-Reverse: GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA.

El procedimiento para la amplificación del gen se estandarizó a un volumen total de 25 µl, 5 µl de ADN y la enzima Go taq flexi de Promega. Además, se cambiaron las condiciones del PCR según nuestros requerimientos (Ver tabla 1 y 2).

6.6.4 Detección de *Leishmania* amplificando el gen mitocondrial del citocromo B.

Para este procedimiento se utilizó la técnica de nested PCR y los procedimientos propuestos por Kato et al (2005). En la primera etapa se usaron los primers L.CYT-AS= GCG GAG AGR ARG AAA AGG C y L.CYT-AR= CCA CTC ATA AAT ATA CTA TA, y 1 µl de ADN para ajustar el volumen total a 25 µl. Posteriormente en la segunda etapa, se utilizó como ADN molde 1 µl del producto de la amplificación de la primera etapa y se emplearon los primers L.CYT-S= GGT GTA GGT TTT AGT YTA GG y L.CYT-R= CTA CAA TAA ACA AAT CAT AAT ATR CAA TT y el volumen total se ajustó a 25 µl. Para las dos etapas se empleó el mismo programa del termociclador, y

tras finalizar ambas etapas, el producto final esperado fue de 350 pb. Se utilizó polimerasa Platinum Taq para las amplificaciones.

6.6.5 Electroforesis en gel de agarosa

Los resultados de las amplificaciones del gen CYTB fueron observados tras realizar la electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos. Se usaron geles de agarosa al 2%. Para la preparación, se pesaron 0,8 gramos de Agarosa Ultra Pure (Invitrogen) y se agregó 40 ml de TAE 1X en un matraz Erlenmeyer. Se procedió a agitar el matraz y a calentarlo en un microondas por 40 segundos dos veces seguidas, al finalizar el primer calentamiento se agitó el matraz por 20 segundos y al terminar el segundo calentamiento se agitó nuevamente el matraz hasta que la agarosa estaba totalmente disuelta en el TAE 1X. Se dejó enfriar por 2 minutos y se agregó 1,5 μ l de SYBER SAFE, se agitó el matraz hasta que el SYBER SAFE estaba completamente mezclado. El contenido del matraz se vertió sobre el portagel (que posteriormente se colocaría dentro de la cámara de electroforesis), y se le puso el peine para formar los pocillos que albergan las muestras. Se dejó enfriar el gel durante 30 minutos para que solidifique, se retiró el peine y se armó la cámara de electroforesis (BioRad), para finalmente llenarla con buffer TAE 1X.

Se usaron 5 μ l de los amplicones y 2 μ l de Loading Blue Orange Dye, 6X, dando un volumen total de 7 μ l los cuales fueron cargados en cada uno de los pocillos del gel. De los amplicones obtenidos usando la enzima Flexi de promega, se usaron 5 μ l y se cargaron directamente en los pocillos ya que el kit de promega cuenta con loading buffer incorporado. En todos los geles que se realizaron se usó un ladder de 100 bp. Por último, se puso la tapa de la cámara de electroforesis, se conectaron los cables de poder, tanto el positivo como el negativo, provenientes de la fuente de poder y se corrió el gel

a 80 V por 50 minutos. Al terminar de correr el gel se lo sacó y se lo llevó al fotodocumentador BioRad para obtener una foto y poder ver los resultados obtenidos.

6.6.6 Secuenciamiento y análisis de secuencias

Se obtuvieron un total de 25 muestras positivas, 20 µl de cada uno de los amplicones fueron mandados a secuenciar a la empresa MacroGen ubicada en Corea del Sur. Los resultados fueron enviados por correo electrónico en aproximadamente una semana.

Se utilizó el software MEGA 7.0.21 para alinear y limpiar las secuencias obtenidas. Se obtuvo una secuencia consenso que pudo ser identificada realizando una búsqueda BLAST que permitió identificar las fuentes sanguíneas de las que se habían alimentado los flebótomos usados en el estudio (Ver tabla 3).

7 LIMITACIONES

- Este trabajo puntual de investigación tuvo como finalidad principal encontrar las fuentes de alimentación sanguínea de las hembras de flebótomos en las tres localidades de estudio y no pretendió hacer análisis sobre la fauna de flebótomos en esos lugares. Solamente las hembras de flebótomos con alimentación sanguínea fueron analizadas en este estudio. Muchos más flebótomos fueron colectados (Ver figura 8), su identificación está en proceso y será tema de futuros reportes, pero no es parte de este estudio.
- Por ende, en este estudio tampoco se hace énfasis en el análisis estadístico de la cantidad de individuos de cada especie colectados ni de la composición de la fauna de flebótomos en cada localidad. Los resultados y discusión abordan

brevemente total de individuos colectados en cada localidad, proporciones de machos y hembras, posibles causas de estas proporciones y otras generalidades. Las observaciones del comportamiento que se realizan se refieren más hacia preferencias tróficas y antropofilia en base a los resultados obtenidos y bibliografía revisada.

- La baja cantidad de individuos alimentados que se encontró y fue analizado tampoco permite emitir criterios concluyentes respecto al comportamiento y preferencias tróficas de las especies analizadas. Permite solamente ver tendencias y emitir conclusiones puntuales respecto a estas muestras particulares obtenidas bajo las condiciones y tiempos de colección descritos. El comportamiento y preferencias de las especies podría ser diferente en otras localidades geográficas, tiempo o bajo diferentes particularidades de colección.

8 RESULTADOS

8.1 Colección de especímenes de flebótomos

Para este estudio se colectaron un total de 2439 especímenes de flebótomos, los cuales fueron colectados en 3 localidades diferentes de tres provincias distintas. La localidad de Damas en la provincia de El Oro, en Bucay en el Guayas y en Zumba en Zamora Chinchipe (Ver figura 8). De todos los especímenes colectados el 9,51% y el 90,49% fueron machos y hembras respectivamente (Ver figura 9). El 4,80% de los especímenes fueron colectados en la provincia del Oro, el 5,99% en la provincia de Zamora Chinchipe y el 89,22% en la provincia de Guayas. Del total de especímenes machos la mayor parte se colectó en Bucay, seguido por los colectados en Damas y por los de Zumba, mientras que, del total de las hembras colectadas, la mayor parte fue en

Bucay, y a diferencia de los machos, se colectaron más en Zumba que en Damas (Ver figura 10).

De las 2207 hembras colectadas entre todas las localidades, solamente 37 especímenes presentaron ingesta de sangre en distintas etapas de digestión representando el 1,65% del total de hembras colectadas. De las 37 hembras con sangre, 10 (0,45%) provienen de las colectadas de el Oro, 7 (0,31%) de las colectadas de Zamora Chinchipe y 20 (0,89%) de la provincia del Guayas localidad de Bucay (Ver figura 11).

8.2 Análisis taxonómicos de especímenes

En el presente estudio se encontraron especímenes alimentados de sangre pertenecientes a 7 especies en las 3 localidades de estudio. Posiblemente, muchas otras especies están presentes en estas localidades, pero los individuos no fueron identificados ni analizados pues se enfatiza que este estudio se restringió a las hembras de flebotomos encontradas alimentadas con sangre. De las localidades de estudio, dos de las tres provincias pertenecen a la costa del Ecuador (El Oro y Guayas) mientras que una pertenece a la región amazónica (Zamora Chinchipe). Las especies que se encontraron alimentadas con sangre en la costa fueron *Lutzomyia trapidoi*, *Lutzomyia amazonensis*, *Lutzomyia hartmanni*, *Lutzomyia serrana*, *Lutzomyia carrerai* y *Lutzomyia hirsuta*, y los especímenes colectados, alimentados de sangre más abundantes fueron *Lutzomyia trapidoi* y *Lutzomyia hartmanni*. La única especie que se encontró alimentada de sangre en la Amazonia fue *Lutzomyia robusta* (Ver figura 12).

8.3 Biología Molecular

8.3.1 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN varía en cada muestra entre los 2,5 ng/ μ l hasta los 6,1 ng/ μ l. La relación 260/280 en la gran mayoría de las muestras es mayor a 1,5 y la relación 230/260 oscila entre 0,13 a 1,63 (Ver tabla 4).

8.3.2 Amplificación y secuenciación

Se amplificaron 25 muestras en total y se utilizó como marcador molecular al ADN mitocondrial correspondiente a un fragmento del gen CYTB de 358 pares de bases (Ver figura 16).

Todas las muestras están codificadas desde la B1 hasta la B14.9 y están clasificadas según la zona en la que fueron colectadas. Las secuencias obtenidas presentan por lo menos 97% de solapamiento con las secuencias encontradas en el NCBI tras hacer una búsqueda BLAST (Ver tabla 3).

8.3.3 Determinación de las fuentes sanguíneas de alimentación amplificando el gen CYTB.

De un total de 2207 hembras colectadas, 111 (5,03%) tenían huevos en el abdomen y solamente 37 (1,65%) tuvieron alimentación de sangre en distintas etapas de digestión. De estas 37 muestras, en solo 25 (67,57%) se tuvo una amplificación exitosa de ADN y en 24 se obtuvo secuencias que tuvieron homología al compararlas usando una búsqueda BLAST (Ver tabla 3).

Tras la identificación se determinó que la sangre de la que se alimentaron los individuos de las diferentes especies de flebotomos, correspondía a 2 especies de

vertebrados, *Homo sapiens* con el 84% y a *Gallus gallus* con el 16% (Ver tabla 4 y figura 13).

De las especies colectadas en donde se encontraron hembras con sangre, se determinó que todas presentan comportamiento antropofílico y que *Lutzomyia amazonensis*, *Lutzomyia hartmanni* y *Lutzomyia robusta* se alimentan además de *Gallus gallus* (Ver figura 14).

8.3.4 Tendencias tróficas de las especies encontradas alimentadas con sangre.

De las localidades ubicadas en la costa pacífica del Ecuador (Damas y Bucay) 12 (48%) de los 25 especímenes colectados correspondieron a *Lutzomyia trapidoi*, esta especie no se encontró en Zumba. De los 12 individuos, 10 se encontraron en el bosque secundario de Bucay, 1 en el intradomicilio y 1 en el peridomicilio de algunas viviendas de la localidad de Damas. De los 12 especímenes todos se alimentaron de sangre humana excepto 1 que se alimentó de sangre de gallina en el peridomicilio de una vivienda de Damas (Ver figuras 12, 14 y 15).

3 individuos de los 25 (12%) corresponden a *Lutzomyia amazonensis*. De estos, 2 fueron colectados en el bosque secundario de Bucay y 1 en el peridomicilio de una de las viviendas de Damas. Los 2 especímenes encontrados en Bucay se alimentaron de sangre humana y el que se encontró en Damas se alimentó de sangre de gallina. 2 especímenes de 25 (8%) corresponden a *Lutzomyia hartmanni*, estos fueron colectados en el peridomicilio de las viviendas de Damas y se encontró que 1 se había alimentado de sangre de gallina y el otro de sangre de ser humano. 1 espécimen de *Lutzomyia carrerai* y 1 espécimen de *Lutzomyia hirsuta* fueron colectados en el bosque secundario de Bucay y los dos se alimentaron del hombre. 1 espécimen adicional correspondía a

Lutzomyia serrana el cual fue colectado en el peridomicilio de una vivienda de Damas y estaba alimentado de sangre de ser humano (Ver figuras 12, 14 y 15).

En la localidad de Zumba que se sitúa hacia la región Amazónica solamente se colectaron 5 (20%) de los 25 individuos alimentados y fue la única especie colectada en esta zona que se encontraba alimentada de sangre. Los 5 especímenes se encontraron en el peridomicilio de algunas viviendas y de éstos, 4 especímenes se encontraron alimentados de sangre humana y uno con sangre de gallina (Ver figuras 12, 14 y 15).

8.3.5 Detección de *Leishmania* con Nested PCR.

Tras realizar el protocolo para amplificar el gen del citocromo B que nos permitiría detectar infección por *Leishmania* en las 37 muestras de hembras de flebótomos alimentadas con sangre, no se obtuvo amplificación alguna indicando que estos especímenes no se encontraban infectados del parásito.

9 DISCUSIÓN

9.1 Especímenes colectados

En el presente estudio se reportó colectas de 2439 flebótomos, la mayoría 2176 equivalente al 89% provenientes de Bucay, provincia del Guayas. Igualmente, del total de individuos colectados el 9,51% corresponde a especímenes machos y el 90,49% a hembras (Ver figura 9). Esta tendencia igualmente se debe a los individuos colectados en Bucay en donde las hembras fueron significativamente más abundantes y en menor grado a las colectas en Zumba en donde se encontró también más hembras que machos (Figura 10). Esto posiblemente se deba a que las colectas en Bucay fueron realizadas en

bosque y ecológicamente corresponde a una zona subtropical en las estribaciones de la Cordillera de los Andes en donde los flebótomos son abundantes. En Bucay los muestreos se realizaron en una zona de bosque secundario ubicado a 500 metros de las viviendas más cercanas, cerca de la carretera, es decir en una zona de bosque cercana al peridomicilio.

Según Vivero et al (2015) los flebótomos se concentran en zonas en donde existe vegetación o bosque y en lugares donde pueden reproducirse como las bases de los arboles grandes o en grandes troncos. Las proporciones muy diferentes entre hembras y machos no se observan en las colectas realizadas en la provincia de El Oro, donde se registró 55,56% y 44,44% de hembras y machos respectivamente. Una mayor cantidad de hembras dentro de una población podrían sugerir una población de individuos saludable (Palacios, 2015).

Al contrario de Bucay, tanto en El Oro en la localidad de Damas como en Zamora Chinchipe en la localidad de Zumba, los muestreos se realizaron en el peridomicilio de las viviendas y en el intradomicilio en zonas rurales al encontrarse abundancia de fincas y cultivos. En estas zonas debido a la colonización ya no hay zonas de bosque cercanas a las carreteras y por ende el acceso a bosques fue logísticamente imposible. La presencia de flebótomos en el peridomicilio sugiere una adaptación a la vida en entornos cercanos al ser humano, sea esto gallineros, chancheras o cultivos de árboles frutales (Nieves et al, 2014). Se ha reportado también que en zonas cercanas a los peridomicilios existe una alta presencia de especies que son vectores de leishmaniasis, lo que podría sugerir que las especies se podrían estar adaptando a vivir en ambientes antropogénicos (Valderrama et al, 2011). En este estudio no se identificó a todos los flebótomos capturados sino solamente a los alimentados por lo que no podemos confirmar esta observación. Los especímenes no alimentados están en proceso de

identificarse; futuros reportes fuera de este estudio podrán abordar temas relacionados diversidad de especies y de vectores en diferentes ambientes. Sin embargo, si podemos confirmar que las especies que encontramos alimentadas todas han sido incriminadas como vectores en otros países y algunas en el Ecuador. Hasta el momento se ha visto que *Lutzomyia trapidoi* es vector incriminado de *Leishmania Viannia panamensis* en la Costa norte de Ecuador. Esta especie ha sido colectada en el intradomicilio y el peridomicilio de hogares ubicados en la localidad Bahía de Aguacate en el departamento del chocó en Colombia (Acosta et al, 2009). Esta zona se caracteriza por ser una región de bosque tropical húmedo similar al encontrado en varias zonas de colecta de nuestro estudio, confirmando lo expuesto por Baum et al (2015), quien dice que *Lutzomyia trapidoi* puede adaptarse sin complicaciones a condiciones antropogénicas, tanto peridomiciliarias como domiciliarias. *Lutzomyia trapidoi* fue registrada en este estudio en muestras del peridomicilio e intradomicilio de algunas viviendas de la localidad de Damas en la provincia del Oro confirmando su comportamiento antropofílico como se reporta en otros estudios (Zapata et al, 2012). Otra especie encontrada fue *Lutzomyia hartmanni*, una especie abundante en la Costa Pacífica de Ecuador y Colombia (Pérez et al, 2011). Estos flebótomos son una especie del suelo que se encuentra en forma abundante tanto en bosque como en frutales y cafetales y tiende a entrar hacia ambientes peridomésticos lo que corrobora nuestros resultados de colecciones de esta especie en peridomicilio en El Oro. Finalmente *Lu. robusta* es una especie cuya identidad taxonómica está en discusión con *Lu. serrana*. Según análisis de mediciones métricas multivariadas por Dujardin et al., 2004, las poblaciones de *Lu. serrana* de Ecuador podrían corresponder más bien a *Lu. robusta* más pequeñas, así como se describe en esta publicación. En publicaciones de los 80s por Le Pont et al., se sugiere a *Lu. robusta* como vector incriminado de bartonelosis en

el foco de Zumba, datos que nuestros hallazgos confirman al capturar esta especie en peridomicilio (Carrasco, 2017). Futuros estudios filogenéticos podrían aclarar si especímenes de *Lutzomyia serrana* de otros lugares e Ecuador pueden corresponder a *Lu. robusta* como sugiere Dujardin o mantenerse como especies independientes. Por otro lado, se ha reportado a *Lutzomyia amazonensis* como vector de *Leishmania (Viannia) naiffi* (causante de leishmaniasis cutánea) (Maroli et al, 2012). Esta especie ha sido vinculada ambientes en donde está mejor conservada la naturaleza por lo que podemos sugerir, según nuestras observaciones, que podría estarse adaptando a condiciones antropogénicas. Se ha reportado en Brasil a *Lutzomyia hirsuta* como vector de *Leishmania (Viannia) braziliensis* causante de leishmaniasis cutánea, a *Lutzomyia carrerai* como vector de *Leishmania (Viannia) braziliensis* y de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* en Brasil y en Bolivia (Bejarano et al, 2006), y a *Lutzomyia serrana* como vector de *Leishmania (Viannia) peruviana* y posible vector de *Leishmania* en el Ecuador (Davies et al, 1993).

9.2 Determinación de las fuentes sanguíneas de alimentación

Los resultados del análisis molecular indican que las 7 especies que se encontraron alimentadas con sangre se alimentaron en alguna ocasión del hombre: *Lutzomyia trapidoi*, *Lutzomyia hartmanni*, *Lutzomyia serrana*, *Lutzomyia robusta*, *Lutzomyia amazonensis*, *Lutzomyia carrerai* y *Lutzomyia hirsuta*. El 84%, es decir 21/25 de los especímenes analizados se alimentaron del ser humano. Solamente el 16%, es decir 4/25 especímenes se alimentaron de gallinas y correspondieron a las siguientes especies *Lutzomyia trapidoi*, *Lutzomyia amazonensis*, *Lutzomyia hartmanni* y *Lutzomyia robusta*. Aquellos que se alimentaron de gallina fueron capturados en el intradomicilio y en el peridomicilio lo que coincide con el área en las casas donde se encuentran las gallinas o los gallineros.

Sin embargo, algunos especímenes que se alimentaron de seres humanos fueron capturados en zonas de bosque (14/21 equivalentes al 66.6%). Estos resultados son interesantes y podrían sugerir que el bosque es frecuentemente visitado por trabajadores temprano en la mañana o hacia el atardecer cuando los flebótomos buscan su alimento o estos se acercan para picar al hombre en casas o poblaciones cercanas lo que se sugiere en algunos reportes (Gómez et al, 2014). Más estudios son necesarios para confirmar estos hallazgos. Por otra parte, la alimentación de los flebótomos de animales domésticos como *Gallus gallus* no causa sorpresa pues frecuentemente se alimentan de la fuente de sangre que esté disponible. En el Brasil, por ejemplo, *Lutzomyia longipalpis* se alimenta frecuentemente en gallineros cerca de las viviendas (Sant'Anna et al, 2010). Se cree que la utilización de gallinas como fuente de alimentación se debe a la proximidad existente entre los flebótomos antropofílicos y los lugares de refugio de estos animales (Rosário et al, 2016), sin embargo, se ha demostrado que la ingesta de sangre de gallina permite que los parásitos de la *Leishmania* aumenten su tasa de reproducción dentro del vector, lo que hace que la carga parasitaria sea más elevada y por consiguiente mayor el nivel infectivo que puedan tener sobre el ser humano (Sant'Anna et al, 2010). Es por esta razón que a pesar de que las gallinas no tienen un rol como reservorios del parásito, si podrían ocasionar mayores tasas de infección en zonas peridomiciliarias.

Sin embargo, si llama la atención no haber encontrado flebótomos alimentados de otras fuentes de sangre especialmente en zonas de bosque. *Sciurus vulgaris granatensis*, *Potos flavus* and *Tamandua tetradactyla*, *Choloepus hoffmani didactylus*, *Rattus rattus*, *Canis familiaris* han sido reportado infectados con *Leishmania* por Hashiguchi et al (2016) y otras especies domésticas como *Capra hircus*, *Equus caballus*, *Bos Taurus*,

Palacios (2015). Más estudios en el futuro podrán complementar las tendencias y preferencias tróficas de los flebótomos observadas durante este trabajo.

Lutzomyia hirsuta, *Lutzomyia carrerai* y *Lutzomyia serrana* se alimentaron solo de seres humanos, sin embargo, solamente 1 espécimen de cada especie fue colectado alimentado y analizado por lo que se observa un cierto comportamiento antropofílico en estas especies, pero no se puede emitir criterios más concluyentes.

Se observa que la mayor cantidad de especies e individuos colectados y que se habían alimentado provienen de las zonas de bosque. Se ha reportado que a medida que las colectas se alejan de estas zonas disminuye la cantidad de individuos y especies colectadas (Valderrama et al, 2011). No obstante, se pudo también observar que las zonas peridomiciliarias son lugares propicios para el desarrollo de especies de flebótomos antropofílicos, y que algunas especies se adaptan a la cercanía del hombre y su entorno en donde encuentran abundancia de alimento y condiciones propicias para su desarrollo, reproducción y ovoposición (Cruz et al, 2013). Los espacios peridomiciliares pueden crear refugios para muchas especies de animales silvestres que ante la destrucción de sus hábitats naturales se adaptan a vivir en el peridomicilio y pueden tener un rol como vectores o reservorios de enfermedades, y tener una participación activa en el ciclo de transmisión de estos patógenos a nivel urbano/periurbano (Ramos et al, 2014).

Se ha visto en este estudio que todas las especies colectadas son antropofílicas, y que, además, se han reportado como transmisoras de leishmaniasis y otras enfermedades en el Ecuador o en otros países. Se sugiere, por ende, que existe un potencial riesgo de transmisión en las localidades en donde realizamos el estudio, puesto que existen condiciones favorables para la transmisión de estas enfermedades. Además, la presencia de especies como *Lutzomyia trapidoi* aumenta el riesgo pues esta especie ha sido

incriminada como uno de los principales vectores de leishmaniasis cutánea en el Ecuador (Arrivillaga et al, 2013). Por otro lado, *Lutzomyia robusta* ha sido incriminado como vector de *Bartonella bacilliformis* en Zumba provincia de Zamora Chinchipe, (Cruz et al, 2013). El riesgo de estas enfermedades puede aumentar en la medida que los flebótomos puedan adaptarse a vivir más cerca del hombre.

Los resultados obtenidos sugieren que la población humana de estas zonas puede estar amenazada y que se deberían tomar medidas de prevención para que disminuya el riesgo de transmisión de enfermedades. Por ejemplo, se ha demostrado en Brasil que la remoción de refugios de animales domésticos como los gallineros hacen que disminuya considerablemente la cantidad de flebótomos colectados en las zonas peridomiciliares (Legriffon et al, 2012). Si la transmisión es intradomiciliar, medidas como usar toldos o toldos impregnados con insecticida puede ayudar a evitar la transmisión, aunque más estudios de dinámica de transmisión son necesarios para emitir recomendaciones más concluyentes

9.3 Análisis Molecular

Del total de individuos colectados solamente el 1,65% presentó ingesta de sangre en su abdomen, porcentaje que es menor en comparación con otros trabajos como el realizado por Palacios et al, quienes obtuvieron un total de 8% de hembras alimentadas en sus colectas y Anaguano et al (2015), quienes obtuvieron un 23,98% de hembras alimentadas en su estudio. Se ha reportado que las hembras más activas son aquellas que aún no han ingerido sangre puesto que buscan un reservorio del cual alimentarse, mientras que las hembras alimentadas suelen verse menos atraídas a la luz debido a que se retiran a lugar de reposo en donde puedan madurar sus huevos y ovopositar, razón por la que su captura con trampas de luz no suele ser muy frecuente (Lozano et al,

2001). Para coleccionar más hembras con ingesta de sangre se podría explorar otras técnicas de colección por ejemplo concentrar las colectas dentro de las casas en lugares en donde las hembras puedan descansar (resting sites) después de una alimentación sanguínea.

Respecto a la eficiencia en la amplificación del ADN para determinar fuentes sanguíneas que para este estudio fue del 67,56%, es decir 25 de 37 especímenes procesados, este porcentaje está por debajo de lo reportado por Soares et al (2014) que reportaron una tasa de 95% de amplificación del gen *cytb* en muestras de ADN colectadas y Anaguano et al (2015) con una tasa de 94,6% de amplificación y por arriba del porcentaje encontrado por Baum et al., 2014 que obtiene una amplificación del 29% de sus muestras. La tasa de amplificación posiblemente depende de múltiples factores como exposición a proteasas y el tiempo desde la captura hasta el procesamiento que se recomienda sea por debajo de 168 horas (Vergara et al, 2017). Al parecer, la eficiencia de la amplificación también depende de la fuente de sangre de la alimentación, por ejemplo, la sangre de aves se digiere mucho más rápido al poseer mayor temperatura (Vergara et al, 2017). La amplificación efectiva del ADN depende de la cantidad de sangre localizada en el abdomen del espécimen que puede variar desde 0,1 μ l hasta 1 μ l dependiendo de la especie y el estado de digestión (Baum et al, 2015).

La no amplificación en varias de las muestras pudo deberse a la presencia de nucleasas o compuestos contaminantes y fenoles que puedan inhibir la amplificación del ADN. En la mayoría de las muestras se obtuvo un porcentaje mayor al 97% de consenso en las secuencias que se analizaron. El gen del *cytb* se considera como bien conservado y ha sido ampliamente usado para identificar fuentes sanguíneas de diversos vertebrados (Lah et al, 2012). El procesamiento de las muestras inmediatamente después de colectadas puede ayudar a una mejor amplificación (Haouas, 2007), sin embargo, es

complicada por la logística que se requeriría en sitios remotos en donde usualmente se hacen las colecciones entomológicas.

9.4 Detección de *Leishmania* con Nested PCR.

En este estudio ninguna de las muestras examinadas mostró infección por *Leishmania*. Otros estudios de infección sugieren que los porcentajes de infección de los flebótomos son generalmente bajos algunas veces menores al 1%. (León, Comm personal). Otros futuros estudios deben incluir más individuos que posiblemente puedan ser analizados en pools de individuos por especie y mediante técnicas moleculares más sensibles como PCR cuantitativo para aumentar la posibilidad de encontrar muestras positivas.

10 CONCLUSIONES

- Se identificó que todas las especies colectadas en este estudio tienen comportamiento antropofílico y han sido incriminadas como vectores de leishmaniasis y otras enfermedades en el Ecuador o en otros países.
- Los resultados sugieren que la población humana que habita en las localidades en donde se realizaron las colectas tienen riesgo potencial de contraer leishmaniasis. La abundancia de flebótomos, su acercamiento al peridomicilio y comportamiento antropofílico aumentan el riesgo de transmisión
- Las preferencias tróficas que se encontraron sugieren adaptación antropogénica de los flebótomos en las localidades estudiadas. Los especímenes se alimentan del hombre en bosque, en el peridomicilio e intradomicilio. Algunas especies en los domicilios aprovechan de la presencia de gallinas para alimentarse también.

- Se confirmó el comportamiento antropofílico de *Lutzomyia trapidoi* y *Lutzomyia robusta* puesto que se alimentaron casi en su totalidad del ser humano a pesar de posiblemente haber tenido otras fuentes de alimentación disponible y en el caso de *Lutzomyia trapidoi* a pesar de haberse encontrado especímenes alimentados del hombre en bosque secundario en donde se esperaría se prefieran alimentarse de animales silvestres.
- En el laboratorio, una mayor tasa de amplificación del gen *cytb*. podría obtenerse con muestras de flebótomos que tengan menor tasa de degradación de la sangre
- El porcentaje de solapamiento de las secuencias que se obtuvieron demuestran que el gen *cytb* es bastante bien conservado para la identificación de fuentes sanguíneas provenientes de vertebrados

11 RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar más colecciones entomológicas tanto en estas como en otras localidades para confirmar las tendencias tróficas encontradas en este estudio.

Se recomienda que las muestras de flebótomos sean mantenidas usando una cadena permanente de frío (refrigeración a -20°C) para minimizar la acción de proteasas, y poder contar con muestras con mejor ADN para la amplificación del gen *cytb*.

De igual forma es de importancia que se siga estudiando las preferencias alimentarias de flebótomos en distintas partes del Ecuador en donde estos puedan transmitir enfermedades para conocer mejor los ciclos naturales de la *Leishmania* y de otros patógenos y como estos se adaptan a la cercanía del hombre y poder implementar

las medidas más adecuadas para prevenir y controlar la transmisión de leishmaniasis y otras enfermedades transmitidas por flebótomos.

12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, I., Cunio, R., & Warburg, A. (2009). Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(1), 79-86.
- Acosta, L., Contreras, M., Vivero, R., Perez, J., Cadena, H., & Velez, A. (2009). Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de importancia medica asociados a casos de leishmaniosis cutánea en Acandi, Choco. *Biomédica*, 29, 281-309.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004349.
- Alkan, C., Zapata, S., Bichaud, L., Moureau, G., Lemey, P., Firth, A. E., ... & Charrel, R. N. (2015). Ecuador Paraiso Escondido virus, a new flavivirus isolated from New World sandflies in Ecuador is the first representative of a novel clade in the genus *Flavivirus*. *Journal of virology*, JVI-01543.
- Anaguano, D. F., Ponce, P., Baldeón, M. E., Santander, S., & Cevallos, V. (2015). Blood-meal identification in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Valle Hermoso, a high prevalence zone for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta tropica*, 152, 116-120.
- Annex, F. D. F. G. (2015). "Sand Flies".
- Arrivillaga, J., Ponce, P., & Cevallos, V. (2013). Primer registro de flebotomínos para la Provincia Carchi en el Ecuador, *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Pshychodidae: Phlebotominae). *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 53(2), 198-201.
- Baum, M., de Castro, E. A., Pinto, M. C., Goulart, T. M., Baura, W., do Rocio Klisiowicz, D., & da Costa-Ribeiro, M. C. V. (2015). Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil. *Acta tropica*, 143, 8-12.
- Bejarano, E. E., Duque, P., & Vélez, I. D. (2006). Estudio de los flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) antropofilicos de la Serranía de La Macarena, Colombia/Survey of the anthropophilic phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Serranía de La Macarena, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 32(2), 176.
- Brazil, R. P., Rodrigues, A. A. F., & Andrade Filho, J. D. (2015). Sand fly vectors of *Leishmania* in the Americas-a mini review. *Entomology, Ornithology & Herpetology*, 4(2), 1.

- Calvopiña, M., Armijos, R. X., & Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge-a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(7), 663-672.
- Carrasco Montalvo, A. R. (2017). *Detección molecular de Bartonella bacilliformis en flebótomos (Diptera: Psychodidae) en la zona fronteriza Ecuatoriana-Peruana* (Bachelor's thesis, Quito: USFQ, 2017).
- Cruz, C. F. R., Cruz, M. F. R., & Galati, E. A. B. (2013). Sandflies (Diptera: Psychodidae) in rural and urban environments in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(3), 303-311.
- da Silva Sales, K. G., Costa, P. L., de Moraes, R. C. S., Otranto, D., Brandão-Filho, S. P., de Paiva Cavalcanti, M., & Dantas-Torres, F. (2015). Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. *Parasites & vectors*, 8(1), 230.
- Davies, C. R., Fernandez, M., Paz, L., Roncal, N., & Llanos-Cuentas, A. (1993). Lutzomyia verrucarum can transmit Leishmania peruviana, the aetiological agent of Andean cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(5), 603-606.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 27(5), 305-318.
- Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F., Andry, P. E., & Peyrefitte, C. (2010). Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Eurosurveillance*, 15(10), 19507.
- Dostálová, A., & Volf, P. (2012). Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*, 5(1), 276.
- Dujardin, J. P., & Maritz, E. (2004). Is Lutzomyia serrana (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) present in Ecuador? *Parasite*, 11(2), 211-217.
- Galati, E. A. B. (1995). Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol Dir Malariol San Amb*, 35(Supl 1), 133-142.
- Gomez, E. A., Kato, H., & Hashiguchi, Y. (2014). Man-biting sand fly species and natural infection with the Leishmania promastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. *Acta trópica*, 140, 41-49.
- Haouas, N., Pesson, B., Boudabous, R., Dedet, J. P., Babba, H., & Ravel, C. (2007). Development of a molecular tool for the identification of Leishmania reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77(6), 1054-1059.

- Hashiguchi, Y., Velez, L. N., Villegas, N. V., Mimori, T., Gomez, E. A., & Kato, H. (2017). Leishmaniasis in Ecuador: comprehensive review and current status. *Acta tropica*, *166*, 299-315.
- Kato, H., Uezato, H., Katakura, K., Calvopina, M., Marco, J. D., Barroso, P. A., ... & Nonaka, S. (2005). Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *72*(1), 87-93.
- Kline, D. L., Hogsette, J. A., & Müller, G. C. (2011). Comparison of various configurations of CDC-type traps for the collection of *Phlebotomus papatasi* Scopoli in southern Israel. *Journal of Vector Ecology*, *36*, S212-S218.
- Lah, E. F. C., Ahamad, M., Haron, M. S., & Ming, H. T. (2012). Establishment of a molecular tool for blood meal identification in Malaysia. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, *2*(3), 223.
- Legriffon, C. M. D. O., Reinhold-Castro, K. R., Fenelon, V. C., Neitzke-Abreu, H. C., & Teodoro, U. (2012). Sandfly frequency in a clean and well-organized rural environment in the state of Paraná, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *45*(1), 77-82.
- Lewis, D. J. (1971). Phlebotomid sandflies. *Bulletin of the World Health Organization*, *44*(4), 535.
- Lewis, D. J., Young, D. G., Fairchild, G. B., & Minter, D. M. (1977). Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology*, *2*(4), 319-332.
- Lozano, E. R., & Ortega, E. M. (2001). Datos preliminares sobre el ciclo nictimeral de *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 y *Phlebotomus Sergenti* Parrot, 1917 (Diptera, Psychodidae). In *Anales de Biología* (No. 23, pp. 9-18).
- Lucientes, J., Castillo, J. A., Gracia, M. J., & Peribañez, M. A. (2005). Flebotomos, de la biología al control. *Revista electrónica de veterinaria REDVET*, *6*(8), 1-7.
- Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, M. A., Javadian, E., Rassi, Y., Sadraei, J., & Mohtarami, F. (2009). Blood meal identification in field-captured sand flies: comparison of PCR-RFLP and ELISA assays. *Iranian journal of arthropod-borne diseases*, *3*(1), 8.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2012). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology*, *27*(2), 123-147.
- Nieves, E., Oliveros, J. L., & Rondon, M. (2011). Impacto de *Leishmania amazonensis* y la Sangre de Ave en el Potencial Biológico y Fecundidad de *Lutzomyia migonei* y *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae). *EntomoBrasilis*, *4*(1), 20-25.

- Nieves, E., Oraá, L., Rondón, Y., Sánchez, M., Sánchez, Y., Rojas, M., ... & Cazorla, D. (2014). Effect of environmental disturbance on the population of sandflies and *Leishmania* transmission in an endemic area of Venezuela. *Journal of tropical medicine*, 2014.
- Noguera, P., Rondón, M., & Nieves, E. (2006). Effect of blood source on the survival and fecundity of the sandfly *Lutzomyia ovallesi* Ortiz (Diptera: Psychodidae), vector of *Leishmania*. *Biomedica*, 26, 57-63.
- OMS. (2015). Leishmaniasis. Obtenido el 28 de Septiembre 2018 de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- OMS. (2010). Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, Switzerland, 22-26 March 2010. *WHO technical report series*, (949).
- Palacios Cevallos, E. L. (2015). *Identificación molecular de las preferencias tróficas de flebotomos colectados en 5 provincias ecuatorianas* (Bachelor's thesis, Quito: USFQ, 2015).
- Pérez, A., & Bejarano, E. E. (2011). tRNASer (UCN) mitocondrial de *Lutzomyia hartmanni* predicción de la estructura secundaria del tRNASer (UCN) mitocondrial del flebotomíneo *Lutzomyia hartmanni* (Diptera: Psychodidae). *Acta Biológica Colombiana*, 16(1).
- Pérez Mejía, G. E. (2017). *Identificación de fuentes alimentarias de lutzomyia spp. ligadas a casos de leishmaniasis, mediante técnicas moleculares* (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2017.).
- Ramos, W. R., Medeiros, J. F., Julião, G. R., Ríos-Velásquez, C. M., Marialva, E. F., Desmoulière, S. J., ... & Pessoa, F. A. C. (2014). Anthropogenic effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in an Amazonian rural settlement, Brazil. *Acta tropica*, 139, 44-52.
- Rosário, I. N., Andrade, A. J. D., Ligeiro, R., Ishak, R., & Silva, I. M. (2016). Evaluating the Adaptation Process of Sandfly Fauna to Anthropized Environments in a Leishmaniasis Transmission Area in the Brazilian Amazon. *Journal of medical entomology*, 54(2), 450-459.
- Sant'Anna, M. R., Nascimento, A., Alexander, B., Dilger, E., Cavalcante, R. R., Diaz-Albiter, H. M., ... & Dillon, R. J. (2010). Chicken blood provides a suitable meal for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and does not inhibit *Leishmania* development in the gut. *Parasites & vectors*, 3(1), 3.
- Soares, V. Y. R., Silva, J. C. D., Silva, K. R. D., Santos, M. P. D., Ribolla, P. E. M., Alonso, D. P., ... & Costa, C. H. N. (2014). Identification of blood meal sources of *Lutzomyia longipalpis* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the cytochrome B gene. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(3), 379-383.

- Valderrama, A., Tavares, M. G., & Andrade Filho, J. D. (2011). Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(8), 1024-1031.
- Vergara, J. G., Verbel-Vergara, D., Montesino, A. M., Pérez-Doria, A., & Bejarano, E. E. (2017). Estimación del tiempo límite de detección del gen citocromo b de humanos en hembras de *Lutzomyia evansi*. *Biomédica*, 37, 187-192.
- Vivero, R. J., Torres, C., Bejarano, E. E., Peña, H. C., Estrada, L. G., Florez, F., ... & Muskus, C. E. (2015). Study on natural breeding sites of sand flies (Diptera: Phlebotominae) in areas of *Leishmania* transmission in Colombia. *Parasites & vectors*, 8(1), 116.
- Young, D. G., & Duncan, M. A. (1994). *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*. WALTER REED ARMY INST OF RESEARCH WASHINGTON DC.
- Zapata, S., Mejía, L., Le Pont, F., León, R., Pesson, B., Ravel, C., ... & Depaquit, J. (2012). A study of a population of *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador. *Parasites & vectors*, 5(1), 144.

13 TABLAS

Tabla 1.- Protocolo de Amplificación del gen mitocondrial CYTB.

Fuente: (Pérez, 2017).

Protocolo PCR CytB					
1. Preparación de soluciones					
Número de reacciones	10				
Volumen V2 ul	25				
REACTIVO	C1	C2	V1	Volumen Master Mix	
PCR Buffer	5 X	1 X	5 ul	50 ul	
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2 ul	20 ul	
dNTPs	10 mM	0,4 mM	1 ul	10 ul	
Taq Promega	1,25 U/μl	0,0125 U/μl	0,25 ul	2,5 ul	
Primer F	10 μM	0,5 μM	1,25 ul	12,5 ul	
Primer R	10 μM	0,5 μM	1,25 ul	12,5 ul	
ADN	--	20 ng/μl	5 ul	ul	
Agua PCR	--	--	9,3 ul	92,5 ul	
Rx sin Agua			15,8 ul	107,5 ul	
TOTAL			25 ul	200 ul	

Tabla 2.- Programa del termociclador.

Fuente: (Pérez, 2017).

Perfil térmico

Desnaturalización inicial	95° C x 30 min
40 ciclos de amplificación	
Desnaturalización	95° C x 30 s
Alineamiento de primers	58° C x 30 s
Extensión	72° C x 45 s
Extensión final	72° C x 5 min

Tabla 3.- Muestra los resultados del blast de las secuencias obtenidas tras la amplificación del gen del citocromo b mitocondrial.

Fuente: (NCBI).

Muestra	Description	Max score	Total score	Query cover	Evalue	Ident	Accession
B.1	Gallus gallus isolate ACAD14793 , Vietnam mitochondrion, complete genome	469	469	91%	2.00E-128	98%	gi 1188497071 KX099430.1
B.4	Homo sapiens haplogroup 12B1 mitochondrion, complete genome	579	579	100%	2.00E-161	99%	gi 1476439605 MH816937.1
B.8	Homo sapiens haplogroup 12B1 mitochondrion, complete genome	589	589	100%	3.00E-164	100%	gi 1476439605 MH816937.1
B.11	Homo sapiens isolate ECU0923 haplogroup B2b8a mitochondrion, complete genome	410	410	88%	2.00E-110	93%	gi 1241190074 KV680944.1
B.12	Homo sapiens haplogroup 12B1 mitochondrion, complete genome	506	506	95%	2.00E-139	98%	gi 1476439605 MH816937.1
B.13.2	Homo sapiens isolate NIH/FONV/OD468 mitochondrion, complete genome	102	102	39%	8.00E-18	85%	gi 1432007112 MG182528.1
B.13.3	Homo sapiens isolate Zam440 mitochondrion, complete genome	433	433	95%	2.00E-117	93%	gi 401784076 JX303829.1
B.14.1	Homo sapiens isolate I4NC2 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrion	579	579	99%	2.00E-161	98%	gi 891497877 KP126161.1
B.14.2	Homo sapiens isolate I4NC2 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrion	560	560	91%	1.00E-155	99%	gi 891497877 KP126161.1
B.14.3	Homo sapiens mitochondrial Cytb gene for cytochrome b, partial cds, note: 479 PHLEBO	562	562	97%	4.00E-156	96%	gi 1109659504 LC088149.1
B.14.4	Homo sapiens mitochondrial Cytb gene for cytochrome b, partial cds, note: 479 PHLEBO	623	623	98%	1.00E-174	99%	gi 1109659504 LC088149.1
B.14.5	Homo sapiens mitochondrial Cytb gene for cytochrome b, partial cds, note: 479 PHLEBO	621	621	95%	4.00E-174	99%	gi 1109659504 LC088149.1
B.14.6	Homo sapiens isolate CH022 haplogroup C1c mitochondrion, complete genome	583	583	99%	2.00E-162	98%	gi 1315145061 MG571125.1
B.14.7	Homo sapiens isolate HOSA cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrion	550	550	96%	1.00E-152	97%	gi 45655510 AV509658.1
B.14.8	Homo sapiens mitochondrial Cytb gene for cytochrome b, partial cds, note: 479 PHLEBO	608	608	97%	5.00E-170	99%	gi 1109659504 LC088149.1
C.1	Homo sapiens isolate I4NC2 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrion	610	610	100%	1.00E-170	99%	gi 891497877 KP126161.1
C.2	Homo sapiens isolate I4NC2 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrion	542	542	90%	2.00E-150	98%	gi 891497877 KP126161.1
C.3	Gallus gallus isolate C50a cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrion	565	565	99%	3.00E-157	96%	gi 1087418391 DQ512917.1
C.5	Homo sapiens isolate T520 cytochrome B gene, partial cds; mitochondrion	550	550	99%	1.00E-152	97%	gi 1067058266 KK697544.1
AG	Homo sapiens cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrion	639	639	99%	3.00E-179	99%	gi 669252119 KJ801974.1
AH	Homo sapiens isolate I4NC2 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrion	585	585	100%	4.00E-163	97%	gi 891497877 KP126161.1
AO.3	Gallus gallus isolate GAGA cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrion	625	625	97%	3.00E-175	100%	gi 45655492 AV509649.1
AP	Homo sapiens isolate CH022 haplogroup C1c mitochondrion, complete genome	614	614	99%	9.00E-172	99%	gi 1315145061 MG571125.1
AZ4.1	Homo sapiens isolate I4NC2 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrion	614	614	99%	9.00E-172	99%	gi 891497877 KP126161.1
AZ6.1	Homo sapiens isolate I4NC2 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrion	577	577	100%	9.00E-161	99%	gi 891497877 KP126161.1
AZ8.1	Homo sapiens haplogroup 13a mitochondrion, complete genome	615	615	98%	2.00E-172	99%	gi 1004818344 KX859398.1
AZ8.2	Homo sapiens haplogroup 11a1c mitochondrion, complete genome	600	600	100%	1.00E-167	99%	gi 1480241487 MH918097.1
AZ10.1	Gallus gallus isolate C50a cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrion	635	635	99%	4.00E-178	100%	gi 1087418391 DQ512917.1

Tabla 4.- Muestra el resumen de los resultados obtenidos.

Fuente: (LEMMT-USFQ).

26/4/18	Muestra	CYTB	Especie	Especie de la que se alimenta	Localidad	Ubicación	260/280	230/260	Concentración de ADN
1	B1	positivo	<i>Lutzomyia amazonensis</i>	<i>Gallus gallus</i>	EO Damas Peri No.3-01-08-16	Peridomicilio	1,55	0,17	3,4
2	C1	positivo	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>Homo sapiens</i>	EO Damas Gallinas No.02-01-08-16		1,37	0,37	6,1
3	C2	positivo	<i>Lutzomyia hartmanni</i>	<i>Homo sapiens</i>			1,83	0,19	3,4
4	C3	positivo	<i>Lutzomyia hartmanni</i>	<i>Gallus gallus</i>	EO Damas Intra 05-08-16	Intradomicilio	1,75	0,19	3,6
5	C5	positivo	<i>Lutzomyia serrana</i>	<i>Homo sapiens</i>			1,9	0,21	5,1
6	O3	positivo	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>Gallus gallus</i>	ismanchi MM	Peridomicilio	2,87	0,16	4,5
7	Z4.1	positivo	<i>Lutzomyia robusta</i>	<i>Homo sapiens</i>			1,64	0,23	4,6
8	Z6.1	positivo	<i>Lutzomyia robusta</i>	<i>Homo sapiens</i>	Zumba 22-08-16 Pucapamba MM	Peridomicilio	1,92	0,13	3,2
9	Z8.1	positivo	<i>Lutzomyia robusta</i>	<i>Homo sapiens</i>	Zumba 23-08-16 Pucapamba MM		1,57	0,15	4
10	Z8.2	positivo	<i>Lutzomyia robusta</i>	<i>Homo sapiens</i>			2,26	0,16	2,8
11	Z10.1	positivo	<i>Lutzomyia robusta</i>	<i>Gallus gallus</i>	ZC Zumba 31-12-16 Pucapamba casa Celio Cortez MM	Bosque Secundario (Ambiente fragmentado)	1,85	0,21	4,4
12	B4.1	positivo	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hacienda Ozen MM 03-08-17		1,35	1,63	2
13	B8.1	positivo	<i>Lutzomyia amazonensis</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hacienda Ozen Árbol T3-04-08-17	Bosque Secundario (Ambiente fragmentado)	1,7	0,58	4,3
14	B11.1	positivo	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hacienda Ozen Árbol T2-04-08-17		1,57	1,06	2,5
15	B13.1	positivo	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>Homo sapiens</i>		Hacienda Ozen Luz blanca árbol grande 05-08-17	1,76	0,23	7,8
16	B13.2	positivo	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>Homo sapiens</i>	Bosque Secundario (Ambiente fragmentado)		2,09	0,21	5,7
17	B13.3	positivo	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>Homo sapiens</i>		Bosque Secundario (Ambiente fragmentado)	4,01	0,22	2,9
18	B14.1	positivo	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>Homo sapiens</i>	Bosque Secundario (Ambiente fragmentado)		3,86	0,32	2,7
19	B14.2	positivo	<i>Lutzomyia amazonensis</i>	<i>Homo sapiens</i>		Bosque Secundario (Ambiente fragmentado)	1,68	0,68	3,2
20	B14.3	positivo	<i>Lutzomyia carrerai</i>	<i>Homo sapiens</i>	Bosque Secundario (Ambiente fragmentado)		3,64	0,31	4,5
21	B14.4	positivo	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>Homo sapiens</i>		Hacienda Ozen CDC árbol grande 05-08-17	1,37	0,7	7,5
22	B14.5	positivo	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hacienda Ozen CDC árbol grande 05-08-17		2,07	0,12	2,5
23	B14.6	positivo	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>Homo sapiens</i>		Hacienda Ozen CDC árbol grande 05-08-17	6,15	0,08	2,2
24	B14.8	positivo	<i>Lutzomyia hirsuta</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hacienda Ozen CDC árbol grande 05-08-17		1,91	1,42	3,8
25	B14.9	positivo	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>Homo sapiens</i>		Hacienda Ozen CDC árbol grande 05-08-17	2,93	0,1	3

14 FIGURAS.

Figura 1 .- Mapa del Ecuador donde se señala las localidades de colección.

Fuente: (Calderón, 2016).



Figura 2.- Foto del intradomicilio de una vivienda donde se hicieron colectas.

Fuente: (LEMMT-USFQ).



Figura 3.- Foto del peridomicilio de una vivienda en donde se hicieron colectas.
Fuente: (LEMMT-USFQ).



Figura 4.- Trampa mosquito magnet usada durante las colectas en campo.
Fuente: (LEMMT-USFQ).



Figura 5.- Trampa CDC usada durante las colectas en campo.
Fuente: (LEMMT-USFQ).



Figura 6.- Partes de flebótomos para identificación taxonómica.
Fuente: (Ibañez et al, 2011).

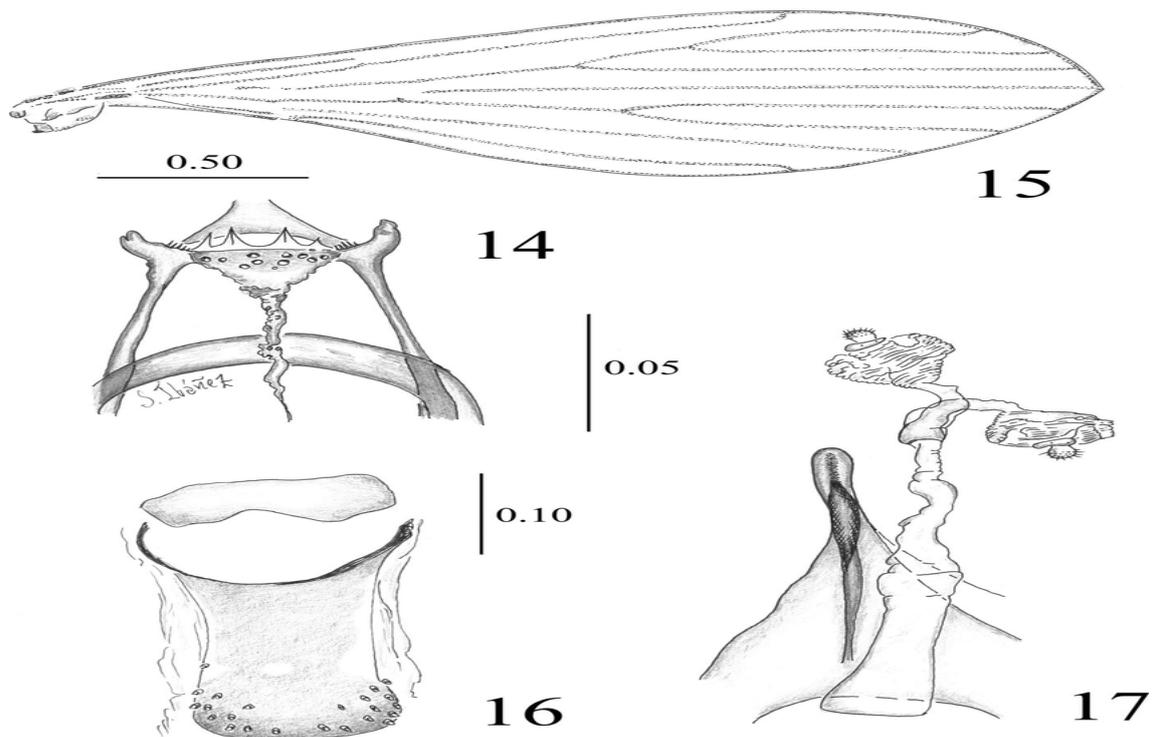


Figura 7.- Muestra de un montaje en placa de las estructuras de un flebótomo listo para su reconocimiento usando microscopio.
Fuente: (Carrasco, 2017).

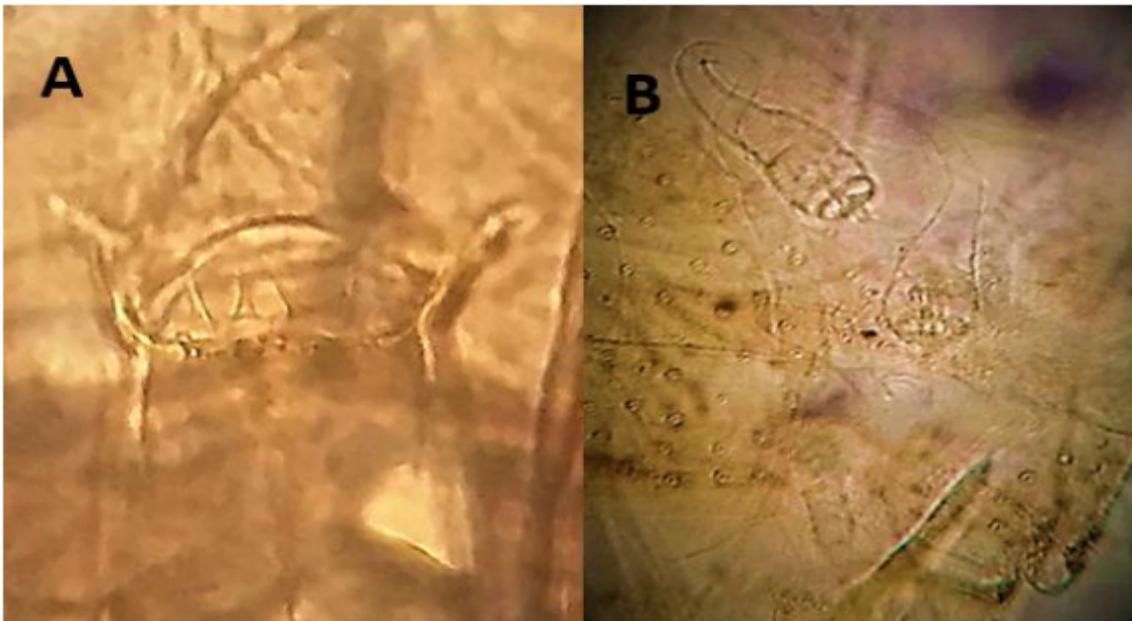
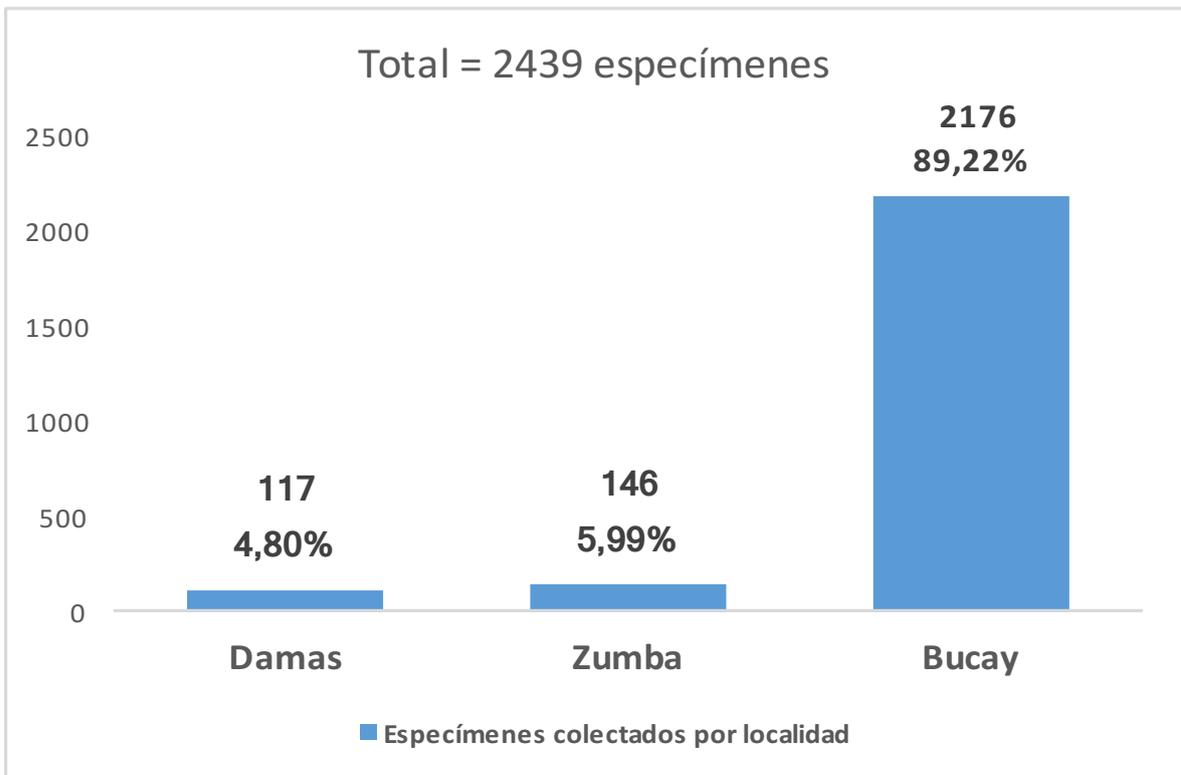
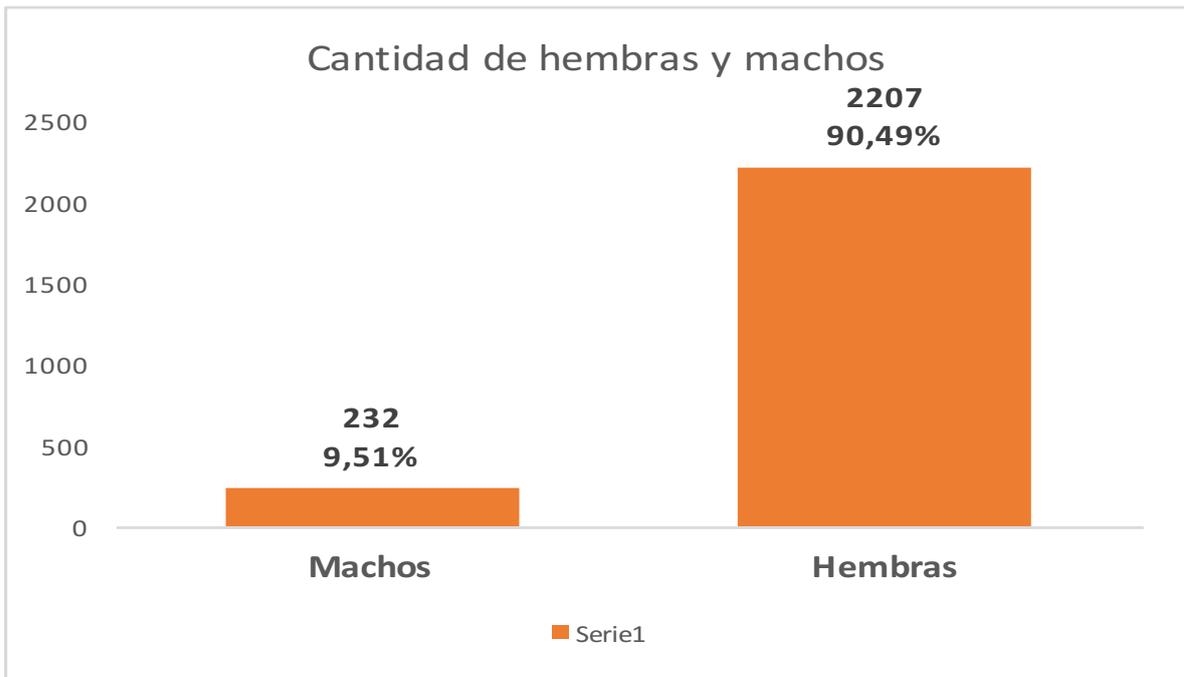


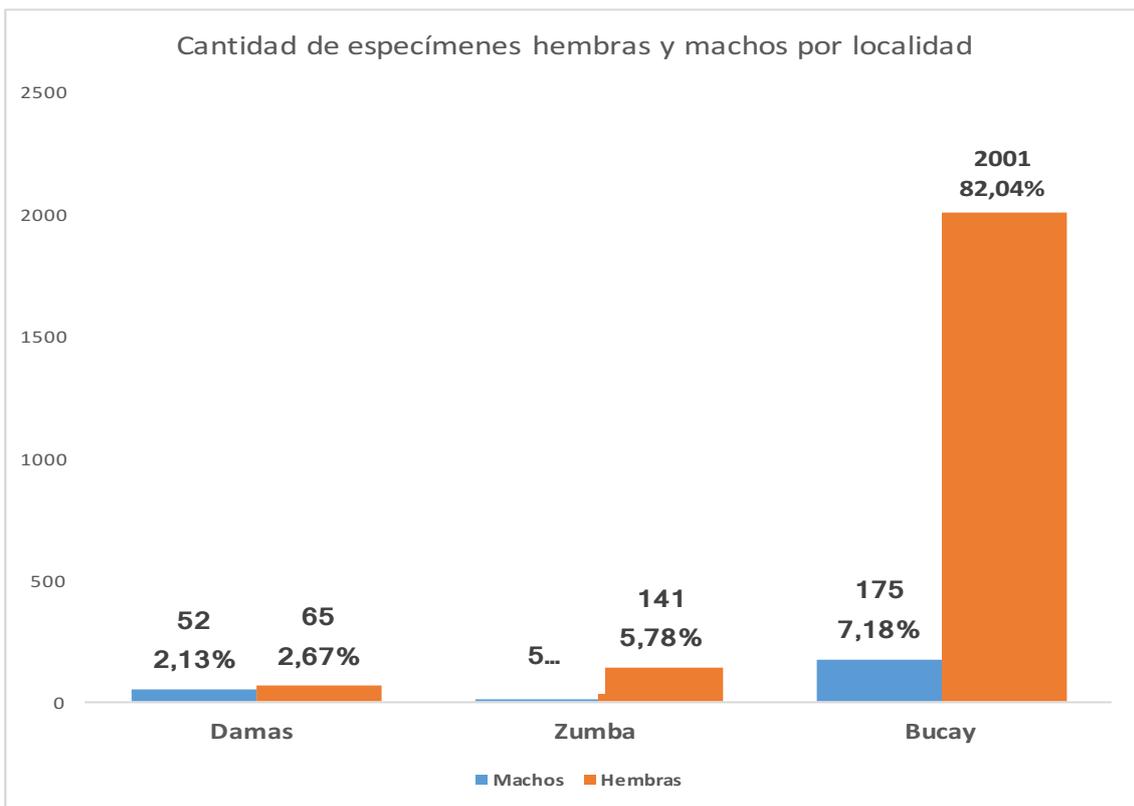
Figura 8.- Cantidad total de especímenes colectados.



Fuente: (LEMMT-USFQ).

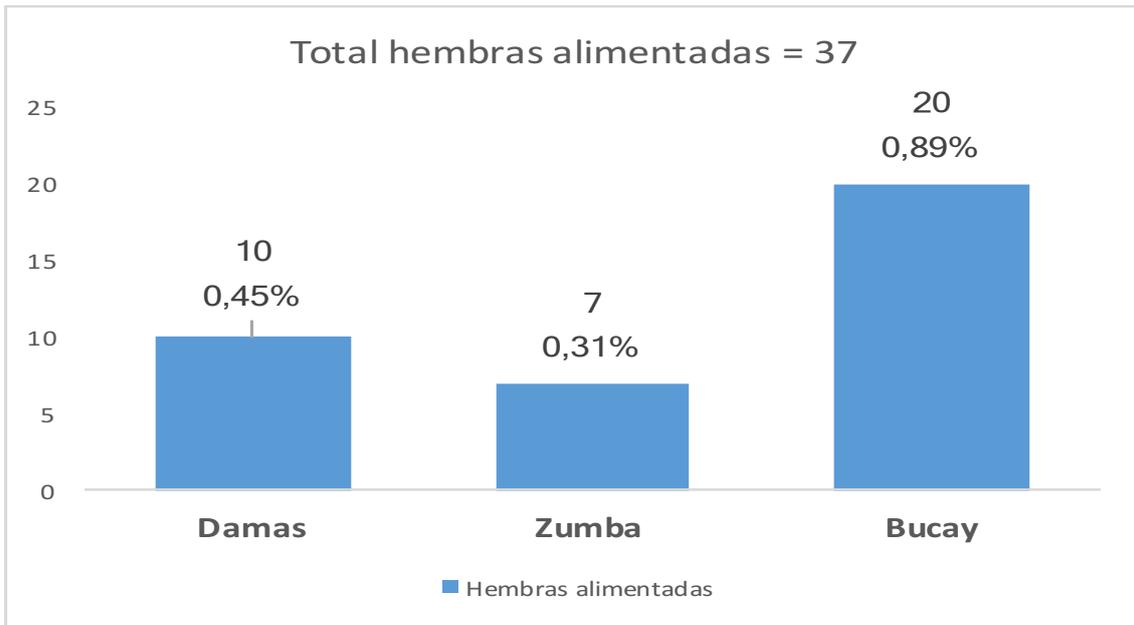
Figura 9.- Total de flebotomos hembras y machos colectados.

Fuente: (LEMMT-USFQ).

Figura 10.- Total de flebotomos hembras y machos colectados por localidad.

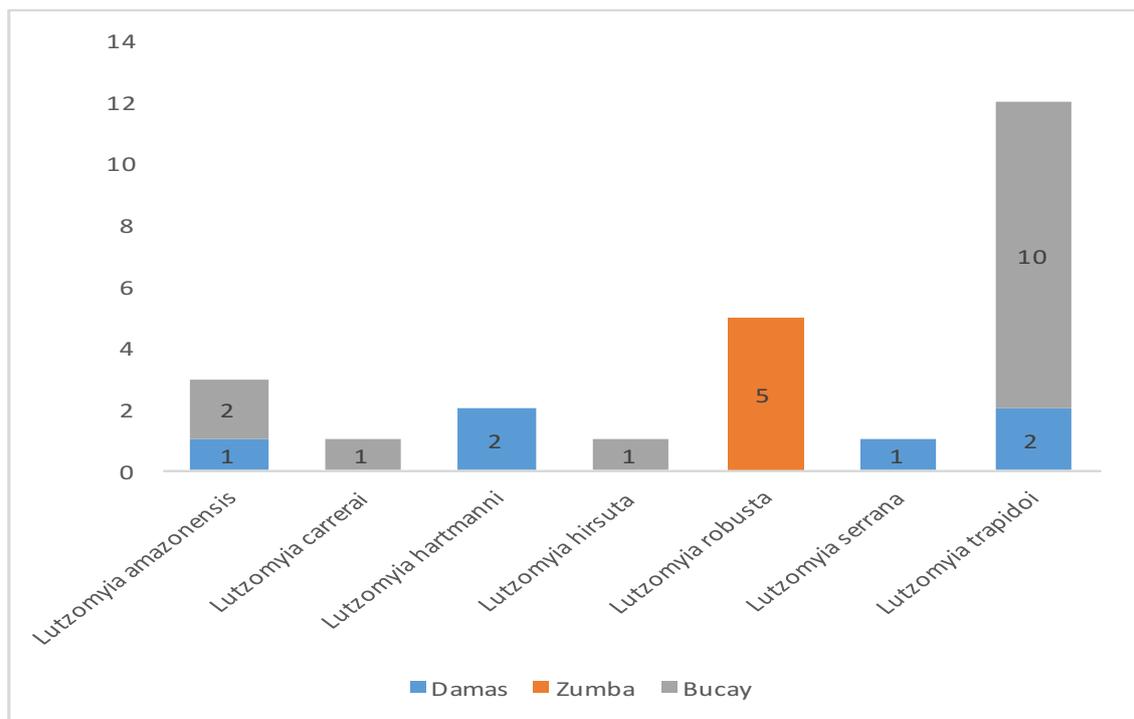
Fuente: (LEMMT-USFQ).

Figura 11.- Total de hembras alimentadas que fueron colectadas equivale al 1,65% del total de hembras colectadas.



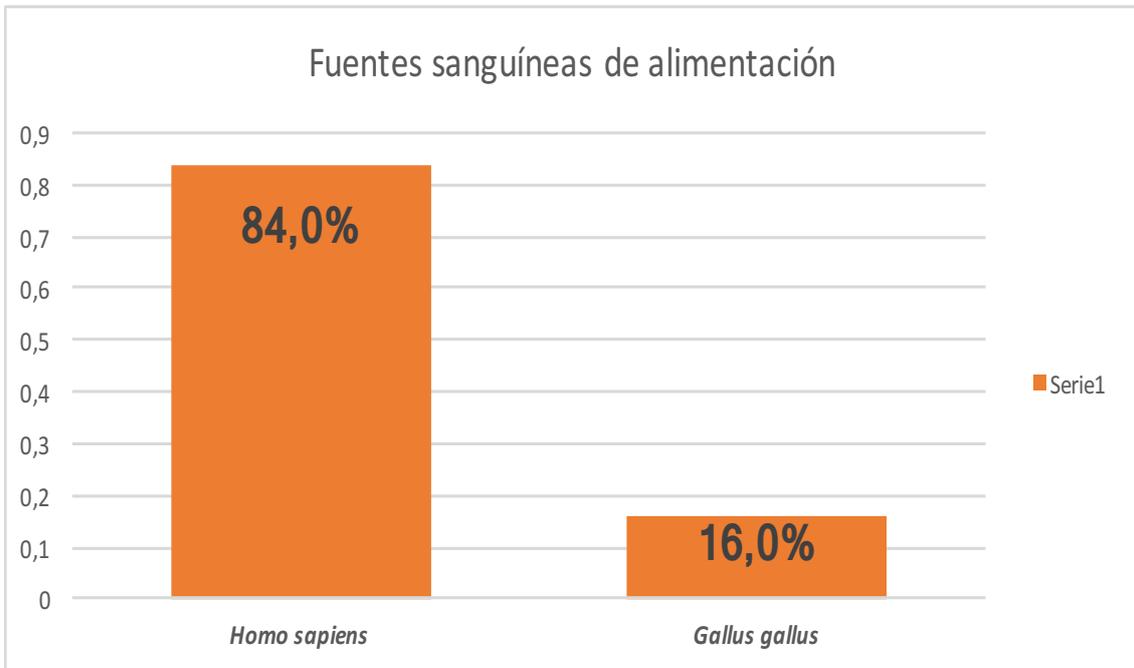
Fuente: (LEMMT-USFQ).

Figura 12.- Flebótomos hembras alimentadas que fueron colectadas en cada localidad.



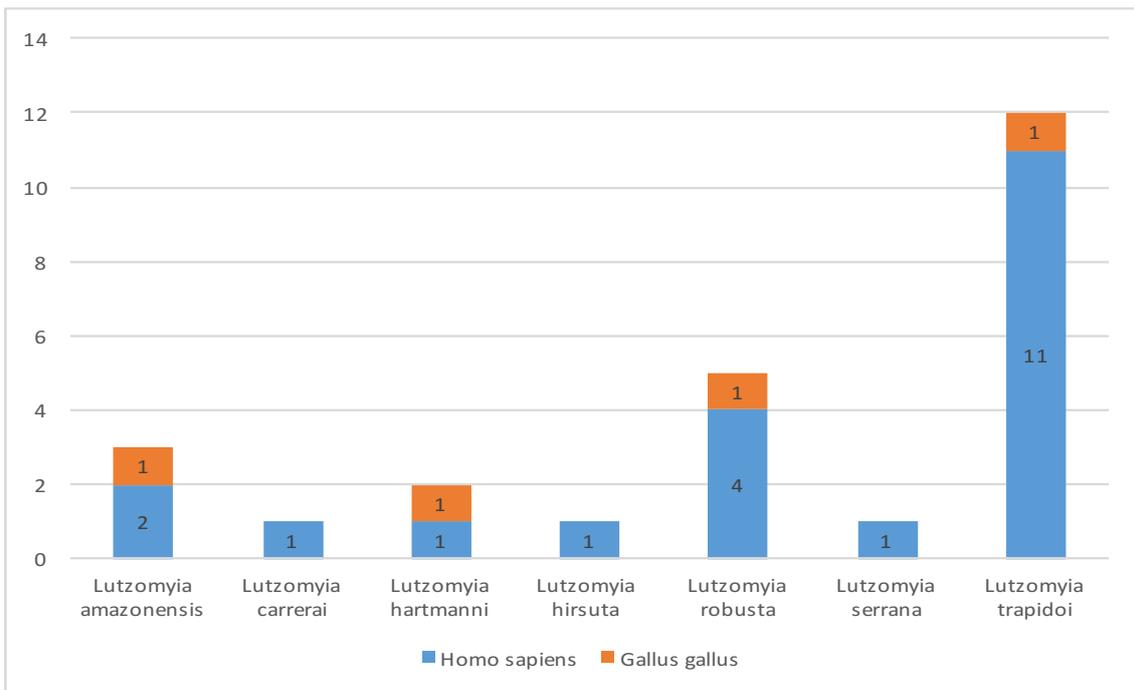
Fuente: (LEMMT-USFQ).

Figura 13.- Muestra el porcentaje de especímenes analizados que se alimentaron de cada una de las fuentes de sangre encontradas en el estudio.



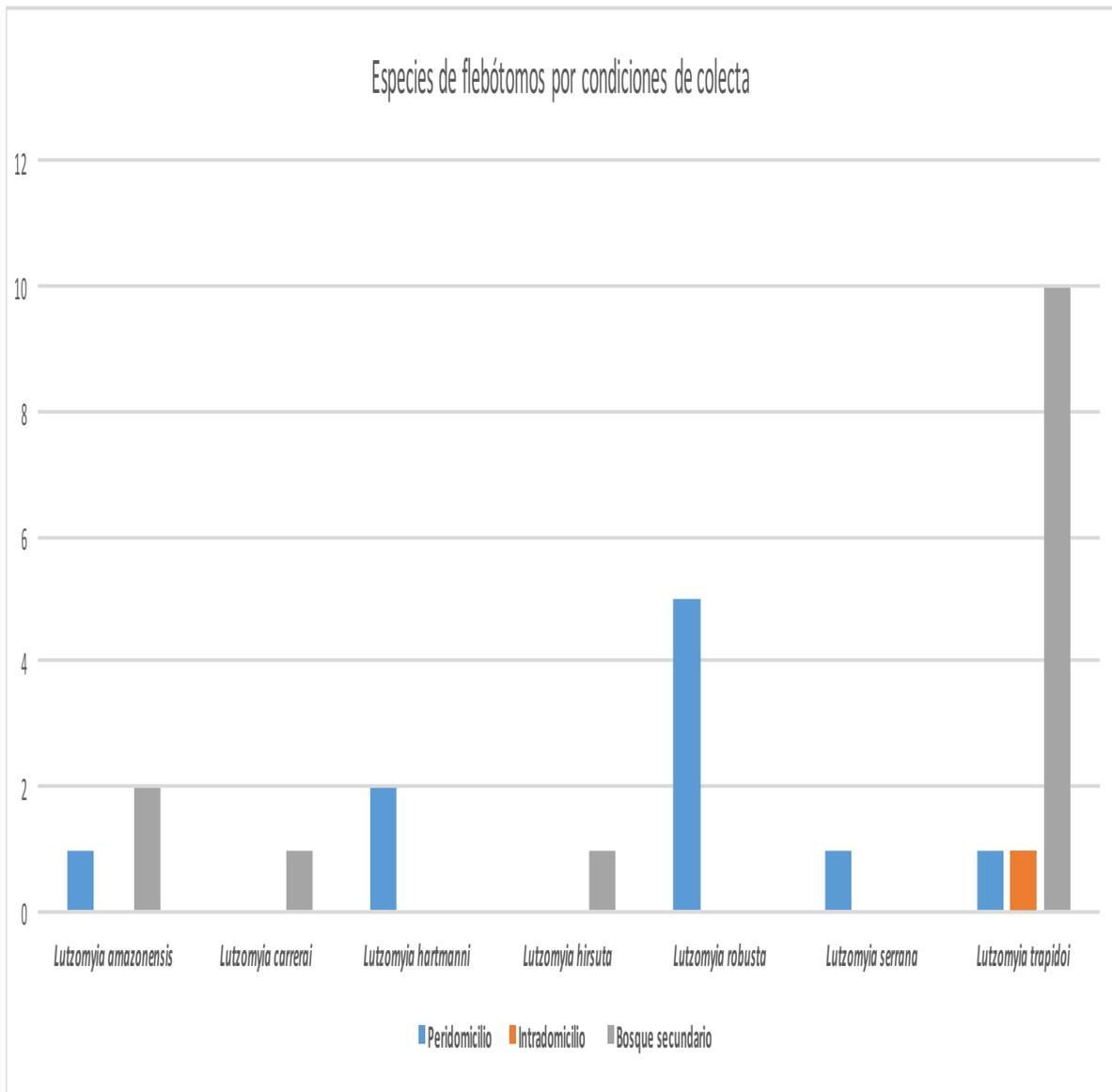
Fuente: (LEMMT-USFQ).

Figura 14.- Fuentes de alimentación de cada una de las especies de flebótomos alimentados.



Fuente: (LEMMT-USFQ).

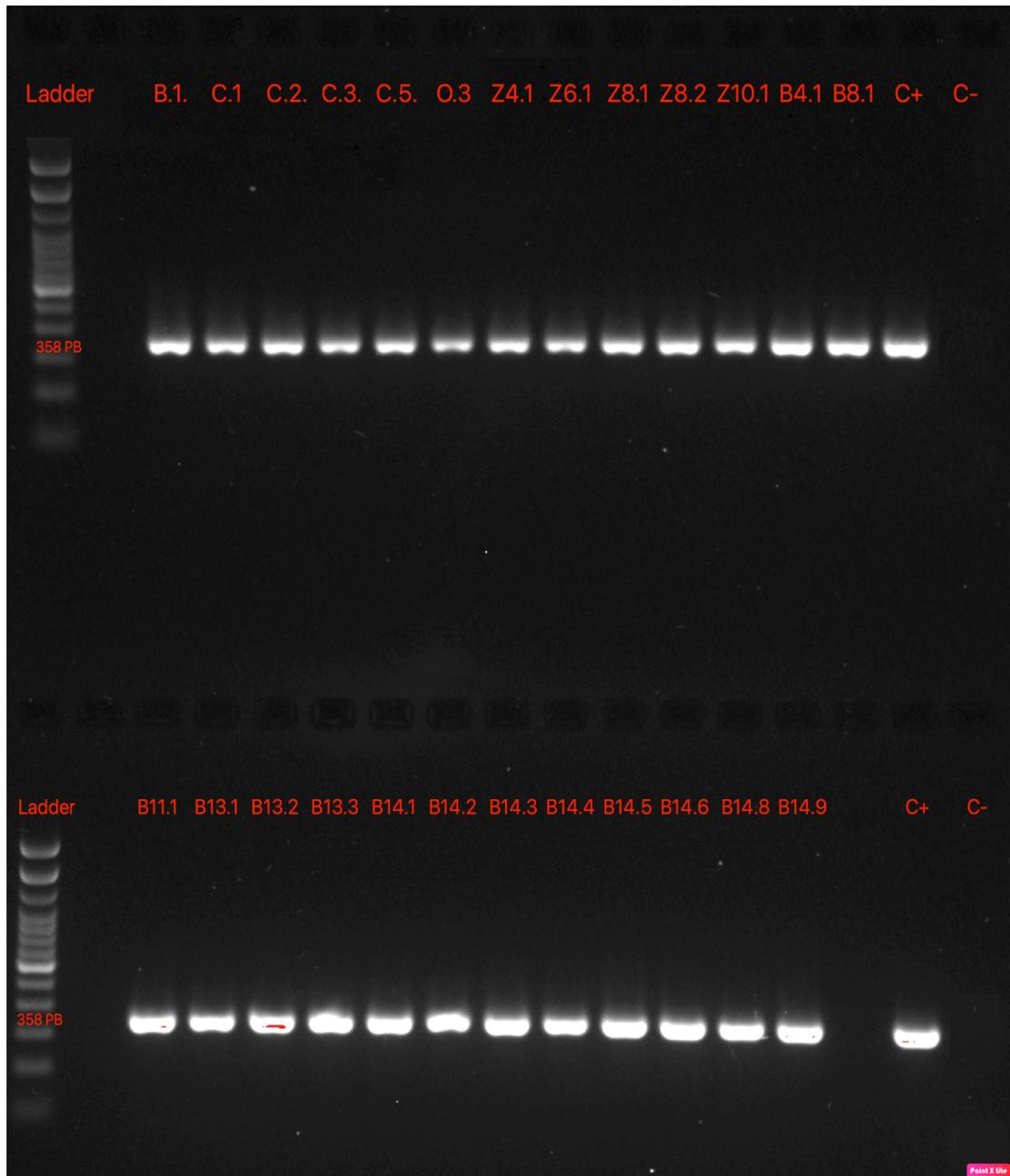
Figura 15.- Muestra la cantidad de especímenes de flebótomos de cada especie colectados ya sea en el intradomicilio, peridomicilio o bosque secundario.



Fuente: (LEMMT-USFQ).

Figura 16.- Gel que muestra las bandas positivas de la amplificación del gen *cvtb*.

Fuente: (LEMMT-USFQ).



Aquí se detallan todas las muestras de ADN extraídas que dieron positivo para la amplificación del gen mitocondrial del citocromo B. Cada una de las muestras están con su respectivo código, los controles positivos están marcados como C+, y los controles negativos como C-.