

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

"Detección molecular de *Bartonella bacilliformis* en flebótomos (Diptera: Psychodidae) en la zona fronteriza Ecuatoriana-Peruana"

Proyecto de Investigación

Andrés Ricardo Carrazco Montalvo

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos.

Quito, 01 de junio de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

"Detección molecular de *Bartonella bacilliformis* en flebótomos (Diptera: Psychodidae) en la zona fronteriza Ecuatoriana-Peruana"

Andrés Ricardo Carrasco Montalvo

Calificación:

.....

Nombre del profesor, Título académico

Renato León , Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 01 de junio de 2017

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: Andrés Ricardo Carrasco Montalvo

Código: 00107934

Cédula de Identidad: 0604104422

Lugar y fecha: Quito, junio de 2017

Dedicatoria

A mis padres, Lucy y Marcelo, que con su trayectoria académica y militante han podido contribuir enormemente a la transformación de la sociedad, eliminando varias estructuras que la deterioran. Siendo así, personas propositivas que con valores y ética han consolidado una familia que lleva principios inclinados al combate de las injusticias diarias.

A mis hermanos, Iván y Cinthya, motores de alegría y optimismo en la cotidianidad de lucha colectiva.

A todas las personas que en pleno Siglo XXI siguen viviendo en condiciones de pobreza con la falta de un hogar, alimento, educación y atención de salud; que con sus trincheras de lucha en el día a día, resisten al Sistema y tienen hambre de conocimiento.

Agradecimientos

A mi familia y amigos, por la fuerza y energía positiva que me han transmitido para superar obstáculos y materializar alegrías.

A la Universidad San Francisco de Quito y al Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical, ya que en sus instalaciones se ha efectuado la investigación práctica.

A Renato León, por su constante apoyo durante el proyecto y la carrera universitaria, permitiendo que la ciencia e investigación, sean prioridades en mi vida académica.

A Víctor Zorrilla, por los conocimientos de taxonomía y biología molecular, impartidos durante el proyecto.

A Milton Gordillo y Edison Ligna, por el apoyo en la resolución de varias preguntas durante el proyecto.

RESUMEN

Los flebótomos (Diptera:Psychodidae) son los únicos vectores conocidos que transmiten la bacteria *Bartonella bacilliformis* que ocasiona la Enfermedad de Carrión o bartonelosis humana, enfermedad encontrada solamente en los países Andinos de Ecuador, Colombia y Perú. Se han reportado cientos de casos cada año en el norte de Perú; sin embargo, la epidemiología, distribución de la enfermedad y vectores incriminados al lado ecuatoriano es mayormente desconocida. Los reportes de los años 50's sugieren que la enfermedad es endémica en la zona sur del país; sin embargo, contrasta con datos más recientes de pocos casos en las últimas décadas: 18 casos en la provincia de Zamora Chinchipe (zona sur del país) entre los años 1995-1996, y 39 casos entre 1995-2005. El objetivo de este estudio fue caracterizar la fauna de flebótomos de la zona, examinar su infección con *Bartonella bacilliformis* e incriminar a posibles vectores. Para esto, se realizó monitoreo entomológico usando trampas de luz CDC, Mosquito Magnet y cebo humano protegido en las localidades de Isimanchi, Pucapamba y Maniales (provincia de Zamora Chinchipe). Se analizaron 114 individuos colectados de los cuales el 94.74% correspondía a *Lutzomyia robusta*, el 4.38% a *Lutzomyia maranonensis* y el 0.88% a *Lutzomyia castanea*. Se examinaron los especímenes mediante PCR y primers para las regiones conservadas de la (1) NADH deshidrogenasa subunidad gamma, (2) la secuencia intergénica 16s-23s del ARNr ITS (Internal Transcribed Spacer) y (3) Nested-PCR para la región mitocondrial del gen de la enzima Citrato Sintasa, encontrándose dos y tres muestras positivas usando los métodos (1) y (2), respectivamente; confirmando estos resultados mediante el método (3). La secuenciación reveló la presencia de ADN de *Bartonella bacilliformis* con el 99% de identidad mediante el método (1), y dos muestras positivas para *Bartonella bacilliformis* con el 93% y 99% de identidad, y una positiva para *Bartonella bovis* con 91% de identidad con el método (2). Este estudio reporta por primera vez, la infección de *Bartonella bacilliformis* en *Lutzomyia robusta*, aportando información para la incriminación de esta especie como vector de la enfermedad. Se reporta también la infección de *Lutzomyia robusta* con *Bartonella bovis*. Se sugieren nuevos estudios en diferentes épocas del año para estudiar estacionalidad, la posible dinámica de transmisión de la enfermedad y evidenciar casos humanos activos o subclínicos, y ampliar el estudio para explorar la infección de *B.bovis* en flebótomos y sus posibles implicaciones en bovinos.

Palabras clave: *Bartonella bacilliformis*, *Lutzomyia*, Ecuador, Perú, Zamora Chinchipe, NADH deshidrogenasa subunidad gamma, ITS, Nested-PCR, Citrato Sintasa.

ABSTRACT

Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) are the only known vectors of the bacteria *Bartonella bacilliformis* which causes Carrion Disease or human bartonellosis. The disease is only present in the Andean countries of Ecuador, Colombia and Peru. Hundreds of cases have been reported every year in northern Peru, however, the epidemiology, distribution of the disease and vectors incriminated at the Ecuadorian side are largely unknown. Reports from the 1950's suggest that the disease is endemic in the southern región of Ecuador, nevertheless this contrasts with more recent data of very few cases reported in the last decades: 18 cases reported from the province of Zamora Chinchipe (Southern Ecuador) between 1995-1996, and 39 cases between 1995-2005. The objective of this study is to characterize the sandfly fauna of the area, examine for sand fly infection with *Bartonella bacilliformis* and incriminate possible vectors. For this purpose, an entomological surveillance was conducted in the localities of Isimanchi, Pucapamba and Maniales (province of Zamora Chinchipe) through the use of CDC traps, the Mosquito Magnet trap and protected human bait. A total of 114 individuals were collected, of which 94.74% corresponded to *Lutzomyia robusta*, 4.38% to *Lutzomyia maranonensis* and 0.88% to *Lutzomyia castanea*. Specimens were examined by PCR and primers for the conserved regions of: (1) NADH dehydrogenase gamma subunit, (2) the 16s-23s intergenic sequence of the ITS rRNA (Internal Transcribed Spacer) and (3) Nested-PCR for the mitochondrial region of the Citrate Sintasa enzyme gene. Two and three positive samples were found using methods (1) and (2), respectively; results were further confirmed using method (3). Sequence analysis of the PCR products revealed the presence of *Bartonella bacilliformis* DNA, with 99% identity by method (1), and two positive samples for *Bartonella bacilliformis* with 93% and 99% identity respectively. Furthermore, one positive sample for *Bartonella bovis* with 91% Identity with method (2) was found. This is the first time that the infection of *Bartonella bacilliformis* in *Lutzomyia robusta* is reported, thus contributing to the incrimination of this species as a vector of the disease. The infection of *Lutzomyia robusta* with *Bartonella bovis* is reported as well. New studies are suggested at different times of the year to study seasonality, the possible transmission dynamics of the disease and evidence of active or subclinical human cases, and to expand the investigation to explore *B. bovis* infection in sand flies and its possible implications to cattle.

Key Words: *Bartonella bacilliformis*, *Lutzomyia*, Ecuador, Peru, Zamora Chinchipe, NADH dehydrogenase gamma subunit, ITS, Nested-PCR, Citrate Sintasa.

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	13
1.1	Género <i>Bartonella</i>	13
1.2	Enfermedad de Carrión o bartonelosis humana	13
1.2.1	Historia.	13
1.2.2	Fases.	14
1.3	El vector	16
1.3.1	Generalidades.	16
1.3.2	Ciclo de vida.	16
1.3.3	Distribución y taxonomía.	17
1.3.4	Transmisión.	18
1.4	Enfermedad de Carrión y distribución del vector, en Ecuador	19
1.4.1	Distribución de la Enfermedad de Carrión en Ecuador.	19
1.4.2	El Vector en Ecuador.	19
1.5	Detección de <i>Bartonella</i> spp.	21
2.	OBJETIVOS	22
2.1	General	22
2.2	Específicos	22
3.	JUSTIFICACIÓN.....	22
4.	ÁREA DE ESTUDIO	24
5.	MATERIALES	24
5.1	Colectas entomológicas	24
5.2	Identificación taxonómica	25
5.3	Extracción de ADN.....	26
5.4	Cuantificación de ADN.....	27
5.5	Amplificación de ADN.....	27
5.5.1	Kit Flexi Promega.....	27
5.5.2	Kit High Fidelity.	27
5.5.3	Kit Platinum.	28
5.5.4	Primers.	28
5.5.5	Materiales y equipos.	28
5.6	Electroforesis en gel de Agarosa	29
5.7	Secuenciamiento	29

6.	MÉTODOS.....	29
6.1	Análisis taxonómicos de especímenes.....	29
6.1.1	Sitios de muestreo.....	29
6.1.2	Toma de muestras.....	30
6.1.3	Separación de muestras.....	31
6.1.4	Montajes.	31
6.1.5	Identificación taxonómica.	32
6.2	Biología Molecular.....	32
6.2.1	Extracción de ADN.....	32
6.2.2	Cuantificación de ADN.....	33
6.2.3	Amplificación de ADN Mitocondrial de la NADH deshidrogenasa subunidad gamma.	33
6.2.4	Amplificación de ADN de la región ITS (Internal transcribed spacer).	34
6.2.5	Amplificación de ADN Mitocondrial del gen de la enzima citrato sintasa (gltA).	34
6.2.6	Electroforesis en gel de agarosa.....	35
6.2.7	Secuenciamiento.	36
6.2.8	Análisis de secuenciamiento.	36
7.	RESULTADOS	37
7.1	Clarificación y montaje.....	37
7.2	Análisis taxonómicos de especímenes.....	37
7.3	Análisis de trampas	38
7.4	Biología Molecular.....	38
7.4.1	Cuantificación de ADN.....	38
7.4.2	Estandarización de protocolos.	38
7.4.3	Amplificación.....	39
7.4.4	Secuenciación.....	40
8.	DISCUSIÓN.....	41
8.1	Método para disección, clarificación y montaje	41
8.2	Taxonomía.....	43
8.3	Análisis de trampas	43
8.4	Amplificación de muestras.....	45
8.4.1	Primers nuoG (región NADH deshidrogenasa subunidad gamma).....	45
8.4.2	Primers ITS (Secuencia Intergénica 16S-23S del ARNr).....	46
8.4.3	Nested-PCR.....	47
8.5	Secuenciación.....	48
8.5.1	<i>Bartonella</i> spp.	48

8.5.2	<i>Lutzomyia robusta</i>	50
9.	CONCLUSIONES	51
10.	RECOMENDACIONES	51
11.	BIBLIOGRAFÍA	52
12.	TABLAS.....	59
13.	FIGURAS.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla No. 1:** Localización de 39 casos de bartonelosis registrados desde el año de 1995 hasta el 2005 en varias zonas ecuatorianas limítrofes con Perú. 59
- Tabla No. 2:** Organización de flebotomos en pools con códigos para extracción de ADN. Se presenta la información de cada individuo y especie para el proceso de extracción. Cada pool corresponde a una misma especie, colectada en el mismo sitio y fecha. Los códigos de pools corresponden a los códigos leídos durante la visualización de bandas en el gel de agarosa. 59
- Tabla No. 3:** Método estandarizado en 4 pasos y con tiempo, para la clarificación y montaje de flebotomos. 60
- Tabla No. 4:** Información detallada de las muestras analizadas taxonómicamente (localidad, parroquia, cantón, provincia, especies, fecha, tipo de trampa y sitio de colecta). 62
- Tabla No. 5:** Cuantificación de 59 pools de ADN extraído. Códigos por pool, fecha y hora de cuantificación, concentración (ng/ μ l), relación 260/280 y 260/230. 63
- Tabla No. 6:** Secuencias de ADN de cada muestra positiva, con la identidad del BLAST en el Gen Bank y la especie correspondiente. 65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1: Máscara de cerámicas de la cultura ecuatoriana Jama-Coaque con Verruga Peruana.	67
Figura No. 2: Infección eritrocitaria durante la Enfermedad de Carrión.....	67
Figura No. 3: Lesiones de Verruga Peruana durante la Enfermedad de Carrión.....	68
Figura No. 4: Flebótomo - <i>Lutzomyia robusta</i>	68
Figura No. 5: Casos de bartonelosis en Zamora Chinchipe.....	69
Figura No. 6: Área de estudio en donde se realizaron las colectas entomológicas.....	70
Figura No. 7: Trampa de luz CDC y sus componentes	71
Figura No. 8: Trampa Mosquito Magnet y sus componentes	71
Figura No. 9: Equipo protector para colección con cebo humano	72
Figura No. 10: Número de flebótomos colectados y clasificados en machos, hembras alimentadas de sangre y hembras sin alimentarse.....	72
Figura No. 11: Número de individuos de las tres especies identificadas	73
Figura No. 12: Dientes horizontales y verticales (A) y espermateca (B) de <i>Lutzomyia robusta</i> ..	73
Figura No. 13: Número de individuos de cada especie de flebótomo localizada en las tres zonas de colecta	74
Figura No. 14: Número de individuos (hembras) de acuerdo al tipo de trampa.....	74
Figura No. 15: Estandarización del protocolo para la detección de <i>Bartonella spp.</i> mediante la amplificación de la región NADH deshidrogenasa subunidad gamma.	75
Figura No. 16: Estandarización del protocolo para la detección de <i>Bartonella spp.</i> mediante la amplificación de la región ITS.....	75
Figura No. 17: Estandarización del protocolo para la detección de <i>Bartonella spp.</i> mediante la amplificación del ADN del gen de la enzima Citrato Sintasa.....	76
Figura No. 18: Detección molecular de <i>Bartonella spp.</i> mediante la amplificación de la región NADH deshidrogenasa subunidad gamma.....	76
Figura No. 19: Detección molecular de <i>Bartonella spp.</i> mediante la amplificación de la región ITS.....	77
Figura No. 20: Detección molecular de <i>Bartonella spp.</i> mediante la amplificación de la región ITS.....	78
Figura No. 21: Detección molecular de <i>Bartonella spp.</i> mediante la amplificación del ADN del gen de la enzima Citrato Sintasa.	78
Figura No. 22: Comparación de la secuencia de la muestra A11 con el genoma completo de <i>Bartonella bacilliformis</i>	79
Figura No. 23: Comparación de la secuencia de la muestra A18 con el genoma completo de <i>Bartonella bacilliformis</i>	79
Figura No. 24: Comparación de la secuencia de la muestra A44 con el genoma completo de <i>Bartonella bacilliformis</i>	80

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Género *Bartonella*

El género *Bartonella* comprende a un grupo de bacterias caracterizadas por adaptarse a la persistencia intracelular en algunos vertebrados, incluyendo roedores, insectívoros, carnívoros y otros mamíferos (Bai, et al., 2012). Dentro de este género, se tienen 29 especies descritas (Mullins, et al., 2013), 7 de estas son consideradas patógenos para los seres humanos (Ministerio de Salud de Perú, 2011).

La primera especie descubierta de este género fue *Bartonella bacilliformis* a principios del año 1900 (Billeter, et al., 2008), y descrita en 1907 (Chian, et al., 2002).

B. bacilliformis es un patógeno de alta importancia médica; definido como bacilo Gram negativo, pleomórfico, flagelado e intracelular. La bacteria mide 0.2-0.5 de ancho por 1-2um de largo (Weinman, et al., 1968), y se transmite a los seres humanos a través de un vector conocido como flebótomo o flebotomino, causando así la Enfermedad de Carrión o comúnmente llamada bartonellosis humana (Brenner, et al., 1991).

1.2 Enfermedad de Carrión o Bartonellosis humana

1.2.1 Historia.

No se ha determinado con exactitud el año en que aparece esta enfermedad en América, sin embargo, varios historiadores sugieren que ya estaba presente cinco siglos A.C, ya que se ha encontrado figuras de la cultura Jama Coaque (Figura No.1) con lesiones similares a las producidas durante el cuadro clínico de bartonellosis (Instituto Nacional de Salud, 2011). A pesar de la antigüedad de la enfermedad, la epidemiología y su ciclo natural son desconocidos (Birtles 1999). Desde el siglo anterior se han

realizado varios estudios para localizar a los reservorios de la enfermedad, y se ha encontrado infección con otras especies de *Bartonella* en animales silvestres y domésticos, más no con *B. bacilliformis*. Hasta el momento, por tanto, el hombre es el único reservorio conocido de *B. bacilliformis* (Angkasekwinai, et.al., 2014). Durante varios años las dos fases de la enfermedad, la fase febril anémica llamada “Fiebre de Oroya” y el periodo eruptivo conocido como “Verruga Peruana”, fueron consideradas como enfermedades diferentes, según la llamada “Teoría dualista” (Burstein & Mayta, 2007). No obstante, en el año de 1885, el estudiante peruano Daniel Carrión, realiza un experimento para comprobar que las dos fases son producidas por el mismo patógeno; se autoinocula material proveniente de la verruga de un paciente con *B. bacilliformis* que presentaba el periodo eruptivo y pronto se manifiesta en él un cuadro febril agudo por el cual fallece demostrando de una manera heroica pero imprudente que el periodo febril antecede a la fase eruptiva, siendo estas dos fases producidas por la misma bacteria (Teoría unicista). Además, encuentra que el periodo de incubación de la bacteria es de 21 días, y que la verruga es de naturaleza infecciosa (Cuadra, M. & Cuadra, M, 2000).

1.2.2 Fases.

1.2.2.1 Fase Febril Anémica “Fiebre de Oroya”.

Es también conocida como fase aguda, primaria o hemática (Huarcaya, et al., 2004). Una vez que el agente vector transmite la bacteria al ser humano, hay un periodo de bacteremia aguda en un rango de 10 a 210 días (Maguiña, et al., 2009). *B. bacilliformis* coloniza la totalidad del sistema circulatorio, infectando a los eritrocitos (Figura No.2). Esto lleva a la reducción de aproximadamente el 80% del volumen de

glóbulos con relación al total de la sangre (hematocrito), provocando anemia hemolítica aguda. Entre los síntomas frecuentes de esta fase están la fiebre, mialgia, cefalea, palidez, taquicardia y hepatomegalia (Angkasekwina, 2014). La inmunodeficiencia que se produce puede aumentar la susceptibilidad a infecciones secundarias como salmonelosis, toxoplasmosis, malaria, shigelosis, histoplasmosis y neumocistosis (Minnick, et al., 2014).

1.2.2.2 Fase Eruptiva “Verruga Peruana”.

Es también conocida como la fase crónica, secundaria o eruptiva de la enfermedad. Se manifiesta a través de erupciones o hemangiomas nodulares de sangre que aparecen en la piel (Figura No.3). Esto se produce como consecuencia de la invasión bacteriana dirigida al endotelio capilar, ya que en respuesta a la invasión se generan vacuolas llenas de bacterias, dando lugar a la proliferación celular y por tanto formación de verrugas (Arias, 1986). Las verrugas son de tipo cutáneo, y han sido clasificadas como miliares (pápulas pequeñas rojas de 3mm de diámetro), mulares (nódulos grandes llenos de sangre) y difusas (nódulos subdérmicos de 5mm de diámetro) (Minnick, et al., 2014). Si la fase febril, que frecuentemente es mortal es superada, la fase eruptiva se manifiesta después de cuatro a ocho semanas. Aunque esta fase no produce la muerte, si trae al paciente serios problemas de salud por la severidad de las lesiones, sangrados y difícil cicatrización, además de otros síntomas como: fiebre, linfadenopatía, dolores de huesos, articulaciones y cefalea (Maguiña, et al., 2009).

1.3 El vector

1.3.1 Generalidades.

Los flebótomos o flebotominos (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) son pequeños Dípteros Nematóceros que se caracterizan por su tamaño diminuto de 2-3 mm. Su cuerpo está cubierto de microvellosidades, poseen dos alas y patas largas en proporción a la longitud total del cuerpo (Márquez, 2014). Presentan un color blanquesino o amarillento, por lo que popularmente se les conoce como “manta blanca” o “titira” (Figura No.4). El interés en estos insectos se centra principalmente en el campo médico, porque las hembras, caracterizadas por ser hematófagas, pueden ser vectores de enfermedades que afectan al ser humano como la leishmaniasis, la bartonelosis (Santamaría et al., 2002) y transmiten varios arbovirus como Phlebovirus, Vesiculovirus y algunos Orbivirus (Ghosh et al., 1999).

1.3.2 Ciclo de vida.

Son insectos holometábolos con un ciclo de vida que consta de las siguientes fases: Huevo, cuatro estadíos larvarios, pupas y adultos. Las larvas y pupas son terrestres. El ciclo se inicia con la oviposición de cientos de huevos depositados individualmente en grietas en las casas o en la tierra, en cuevas, orificios de árboles, refugios de animales domésticos y/o en lugares ricos en materia orgánica (Tesh & Guzmán, 1996). Su desarrollo demora de 6 a 9 días. Después de la incubación los huevos eclosionan a pequeñas larvas que se desarrollan en un periodo de 18 a 31 días. Se caracterizan por ser veriformes, alargadas y divididas en segmentos (3 torácicos y 9 abdominales). En los cuatro estadíos larvarios, se alimentan de detrito y material orgánico y viven en la tierra cerca de gallineros o debajo de las hojas en el bosque. Las

larvas de cuarto estadio buscan un lugar seguro para convertirse posteriormente en pupas que miden de 2 a 4 mm, tienen un color dorado y se presentan de forma alargada; su desarrollo dura de 10 a 20 días para finalmente llegar a la última fase en la que se consolida el estadio adulto (Vela, 2014).

1.3.3 Distribución y taxonomía.

Los flebótomos se distribuyen, en su mayoría, en zonas tropicales y subtropicales; también son encontrados en algunos hábitats desérticos o en bosque húmedo y en algunas zonas más altas como en la cordillera Andina (Young & Duncan, 1994). Algunas especies incriminadas como vectores han sido reportadas como intradomiciliares (se encuentran en el interior de una vivienda), o peridomiciliares (cuando están en un radio de cien metros alrededor de una vivienda) aunque la mayoría de especies viven en zonas de bosque (Flores et al., 2006).

La clasificación taxonómica de los flebótomos inicialmente es la descrita por Lewis et al. (1977), en la que se identifican dos géneros de flebótomos en el Viejo Mundo (*Phlebotomus* y *Sergentomyia*) y tres géneros de flebótomos en el Nuevo Mundo (*Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya*). Más de 500 especies de flebótomos han sido descritas, la más alta concentración de especies proviene de los bosques de América del Sur, donde el género *Lutzomyia* es el que predomina (Sacks & Kamhawi, 2001). Este género comprende aproximadamente 400 especies de flebótomos, distribuidos por América del Sur, de las que al menos 33 han sido incriminadas como vectores de enfermedades (Beati et al., 2004). En el Perú se ha descrito 131 especies (Cáceres et al., 2002), en Brasil 221 (CIPA, 2013), en Colombia 150 (Bejarano, 2006), en Bolivia 82 y aproximadamente 76 en Ecuador (Zapata, 2012).

Se proponen dos clasificaciones taxonómicas: (1) la clasificación de flebótomos en el género *Lutzomyia* propuesta por Young & Duncan (1994) que reconoce a 7 subgéneros: *Lutzomyia*, *Pintomyia*, *Viannamyia*, *Nyssomyia*, *Psychodopygus*, *Trichophoromyia* y *Helcocyrtomyia* y, (2) la clasificación propuesta por Galati que ubica a los flebótomos en la tribu Phlebotomini, dentro de la cual se distinguen dos subtribus: Psychodopygina y Lutzomyina. En la tribu Psychodopygina se ubican los géneros: *Viannamyia*, *Psychodopygus*, *Nyssomyia*, *Bichromomyia* y *Trichophoromyia*, mientras que la tribu Lutzomyiina constan cuatro: *Lutzomyia*, *Pintomyia*, *Migonemyia* y *Evandromyia* (Galati, 1995). Esta clasificación es más compleja pues se elevan a géneros los subgéneros propuestos por Young & Duncan por lo que para este trabajo hemos optado por utilizar la primera clasificación.

1.3.4 Transmisión.

La transmisión del parásito *Leishmania spp.* y de la bacteria *Bartonella spp.*, se da exclusivamente por los vectores flebótomos hembras del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Hashiguchi, 2001). El reconocer e identificar los vectores, permite tener información y efectuar sistemas de control vectorial y estudios de epidemiología (Días et al., 1998). En este sentido, la taxonomía convencional, consiste en identificar caracteres morfológicos únicos que diferencian a unas especies de otras dentro del género *Lutzomyia*, donde la genitalia es una de las mejores estructuras para la identificación (Young & Duncan, 1994).

1.4 Enfermedad de Carrión y distribución del vector, en Ecuador

1.4.1 Distribución de la Enfermedad de Carrión en Ecuador.

Esta enfermedad es endémica en América del sur en áreas interandinas del Perú, Ecuador y Colombia. Históricamente, su distribución se ha limitado a valles andinos que están en una altura entre los 800 y 3000 msnm (Birtles, et al., 1999). No obstante, en los últimos años se han registrado nuevas áreas de transmisión, y el número de casos de la enfermedad en los tres países ha incrementado. En Ecuador, se han identificado cuatro áreas endémicas, una de gran importancia es la ubicada en las estribaciones orientales de la Cordillera Andina, provincia de Zamora Chinchipe (Calero, 2015). Han sido identificados 17 casos, entre 1984 y 1995, retrospectivamente de historias clínicas de Centros de Salud de la zona de Zumba, aunque el análisis de muestras de sangre de casos febriles y/o con lesiones, no se ha encontrado a la bacteria en el vector (Cooper et al., 1996). Se reporta un brote de bartonelosis en la zona de Zumba entre 1995 y 1996 con 18 casos de Fiebre de Oroya clásica (fiebre y anemia) y uno con Verruga Peruana (úlceras). Sin embargo, la presencia bacteriológica de *B. bacilliformis* no pudo ser demostrada (en estos casos). Datos no publicados, previstos por el director del hospital de Zumba, registran 39 casos (incluyendo los 18 reportados por Cooper et al., 1996) de bartonelosis distribuidos por varias localidades en la provincia de Zamora Chinchipe (Figura No.5 y Tabla No.1) (Olalla, 2013).

1.4.2 El Vector en Ecuador.

En Ecuador, se ha identificado alrededor de 76 especies de flebótomos pertenecientes al género *Lutzomyia* (Zapata, 2012), 15 han sido reconocidas como antropofílicas y 9 son vectores de parásitos (Calvopiña, 2004). Ninguna de estas

especies ha sido incriminada como vector de *B. bacilliformis*, ya que *Lutzomyia verrucarum* y *Lutzomyia peruensis* –vectores incriminados de la bacteria- no han sido registrados hasta el momento en el país (Alexander, 1995). Son varios los criterios que una especie debe cumplir para ser incriminada como vector, estos se presentan a continuación:

1. El flebótomo debe estar presente en el sitio donde los seres humanos se infecten de *B. bacilliformis*.
2. El vector sospechoso debe estar distribuido igual que la enfermedad, el flebótomo debe estar en cantidad suficiente para mantener la transmisión de patógenos.
3. *B. bacilliformis* debe detectarse en los flebótomos encontrados.
4. Debe demostrarse que los flebótomos infectados, natural o experimentalmente, mantienen la infección a través del ciclo de vida del patógeno.
5. La transmisión experimental de *B. bacilliformis* por mordedura del flebótomo u otros medios, se consideraría una prueba concluyente de que ese flebótomo es un vector del patógeno (Minnick, et al., 2014).

Además de los vectores incriminados en la transmisión de la bacteria, algunos otros flebótomos son sospechosos. Entre estos está *Lu. robusta* y *Lu. maranonensis*, ya que se han encontrado en gran abundancia en las provincias peruanas de Jaén, San Ignacio y Utcubamba; lugares en donde se han detectado casos clínicos de la enfermedad. Estas especies son vectores potenciales, ya que aún no se ha podido demostrar el criterio 3 para que sean consideradas especies vectores (Minnick, et al., 2014).

1.5 Detección de *Bartonella* spp.

La detección e identificación del género *Bartonella* tanto en hospederos mamíferos como en el vector depende de la sensibilidad y especificidad del método que se utilice. Entre los métodos convencionales para detectar el patógeno en el ser humano está el diagnóstico por frotis de sangre mediante tinción Giemsa o Wright, en los que se puede visualizar el parasitismo de las bacterias en glóbulos rojos y por tanto observar a *B. bacilliformis* directamente en la placa; sin embargo, la sensibilidad de esta prueba es muy baja, por lo que muchas veces se necesita aislar la bacteria mediante cultivos de biopsias o hemocultivos de las personas que presentan la enfermedad (Ventura & Padilla, 2006).

Otros métodos, que son más sensibles que el anterior, corresponden a pruebas serológicas, microbiológicas y técnicas histológicas. Entre las pruebas serológicas está el ELISA comúnmente utilizado para detectar otros patógenos, la desventaja de este procedimiento es que la respuesta de anticuerpos al parecer es inespecífica en el humano, y hay reacción cruzada entre las diferentes especies de *Bartonella* (Flores, 2008).

Actualmente, con el desarrollo de la biología molecular, se ha encontrado que la técnica de PCR para la detección de ADN bacteriano es muy sensible, ya que posibilita la amplificación en miles de veces de un fragmento determinado de ácido nucleico, el cual puede ser visualizado en un gel de agarosa y sometido a secuenciación para comprobar su identidad comparando a otras secuencias publicadas. Para esta metodología se han logrado identificar variedad de secuencias en varios genes y propuesto varias modificaciones del método por PCR. Por ejemplo, entre los genes

más utilizados están el de la enzima Citrato Sintasa (*gltA*), secuencia intergénica 16S-23S del ARNr (ITS), gen α de la riboflavina sintasa (*ribC*), genes de las proteínas de shock térmico (*groEL*), proteínas que codifica la división celular (*ftsZ*) y gen de la subunidad β de la ARN polimerasa (*rpoB*) (Flores, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 General

Detectar la infección por *Bartonella bacilliformis* en flebótomos (Diptera:Psychodidae) e identificar sus vectores o posibles vectores en la zona fronteriza ecuatoriano-peruana.

2.2 Específicos

- Realizar un análisis taxonómico de las especies de flebótomos en la zona fronteriza de Zamora Chinchipe y determinar las especies con comportamiento antropofílico.
- Estandarizar un protocolo para la detección molecular de *Bartonella* spp.
- Determinar la presencia de vectores o vectores potenciales en las parroquias de Isimanchi, Pucapamba y Chito.

3. JUSTIFICACIÓN

La zona fronteriza con el Perú ha sido descrita en el pasado como endémica para leishmaniasis y bartonelosis, sin embargo, muy poco se conoce de los detalles de su transmisión ni de las especies de vectores que estarían implicadas. Datos preliminares de colectas entomológicas en los años 90, en la zona de Zumba e

Isimanchi, en la provincia de Zamora Chinchipe, sugieren la presencia de dos especies con comportamiento antropofílico: *Lutzomyia robusta* y *Lutzomyia maranonensis*. Dichas especies han sido colectadas en casas de adobe, de familias que se encontraron viviendo en condiciones de pobreza, alejadas de otras poblaciones. En varios estudios al lado peruano, se confirma que las dos especies son endémicas en las provincias de Jaén, San Ignacio y Utcubamba; en estos sitios se han detectado y confirmado varios casos clínicos de bartonelosis, por lo que estas especies son descritas como vectores potenciales. En la provincia de San Ignacio, está la localidad de Namballe (una zona endémica de bartonelosis). Esta es la primera zona poblada que marca el límite geopolítico de Perú con Ecuador. La distancia de Namballe al puente de las Balsas, que conecta con Ecuador, es de aproximadamente 11.4 km (Google, s.f).

Al contrario de lo que se conoce del Perú, pocos casos de enfermedad han sido reportados en el Ecuador. No se tiene información confiable de casos recientes de bartonelosis y no se ha hecho en años recientes una actualización de la información referente a la fauna de flebótomos que persiste en la zona ni de su comportamiento antropofílico. Este estudio entomológico se realizó con la intención de completar esta información y complementar lo que se conoce del Perú. Considerando que el área tanto al lado peruano como al ecuatoriano es ecológicamente similar es interesante estudiar porque se dan estas diferencias. El primer paso hacia este abordaje más amplio se realiza mediante este estudio puntual que realizó una evaluación entomológica de la fauna de flebótomos presentes en la zona, su comportamiento antropofílico y detección de infección en los vectores utilizando métodos moleculares. Esperamos que los resultados entomológicos encontrados puedan servir de base para otros estudios serológicos para determinar infecciones subclínicas, estudio

socioeconómico y arquitectónicos sobre la construcción de las viviendas que permitan esclarecer las diferencias epidemiológicas y en la casuística entre lo que ocurre al lado peruano y al ecuatoriano. De igual manera, que estos resultados puedan servir a las autoridades de salud de la zona para alertar a la población local del riesgo de transmisión de esta enfermedad poco conocida y de posibles medidas de prevención y de control vectorial que puedan implementarse especialmente dentro de las viviendas.

4. ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras de flebótomos fueron colectadas en la provincia de Zamora Chinchipe durante el mes de noviembre y diciembre del año 2016. La recolección se realizó en casas, peridomicilio y bosques, en zonas aledañas a la carretera Zumba-La Balza, esta última población Ecuatoriana fronteriza con el Perú. Las zonas de colecta fueron (1) Isimanchi que corresponde a la parroquia Chito, (2) Río mayo, que también corresponden a la parroquia Chito y (3) Maniales, que corresponde a la parroquia de Pucapamba. Estas tres zonas forman parte del cantón Chinchipe (Figura No.6).

Los análisis taxonómicos y moleculares del presente estudio, fueron realizados en el Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical (LEMMT) de la Universidad San Francisco de Quito.

5. MATERIALES

5.1 Colectas entomológicas

- Trampas de tipo CDC y techos de las trampas

- Mallas entomológicas
- Ligas
- Baterías de 6V
- Cargador de baterías
- Trampa Mosquito Magnet
- Estructura de soporte de trampa Mosquito Magnet
- Cilindros de gas para trampa Mosquito Magnet
- Frascos de colección
- Tubos de ensayo
- Estereoscopio
- Lupa
- Cajas de Petri
- Pinzas entomológicas
- Etanol al 70%
- GPS

5.2 Identificación taxonómica

- Guantes de Latex
- Cajas de Petri
- Pinzas Entomológicas
- Etanol al 70%
- Placas Portaobjetos
- Placas Cubreobjetos
- Pipetas Pasteur

- Jeringas de 1ml
- Agujas NIPRO de 0.4mm x 13mm
- Solución Marc André
- Goma Cloral
- Mechero Bunsen
- Solución Salina
- Lactofenol
- Euparal
- Estereoscopio
- Microscopio óptico.
- Tubos eppendorf 1.5ml

5.3 Extracción de ADN

- Estereoscopio
- Tubos eppendorf 1.5ml
- Pinzas entomológicas
- Micropistilos
- Micropipetas de 20-200µl y de 100-1000µl.
- DNeasy Blood & Tissue Mini Spin Column Kit (Qiagen)
- Etanol al 100%
- Proteinasa K
- Vortex
- MicroCentrífuga
- Incubador a 53⁰C

5.4 Cuantificación de ADN

- Micropipeta de 0.5-10 μ l.
- Solución blanco, Buffer TE 1X
- Ultra-Pure Distilled Water (Marca: ThermoFischer)
- Muestras de ADN
- Nanodrop 2000 (Marca: ThermoFischer)

5.5 Amplificación de ADN

5.5.1 Kit Flexi Promega.

- Ultra-Pure Distilled Water (Marca: ThermoFischer)
- Buffer 5X
- MgCl₂ 25 mM
- dNTPs 10 μ M
- Primers
- Go Taq
- DNA template

5.5.2 Kit High Fidelity.

- Ultra-Pure Distilled Water (Marca: ThermoFischer)
- PCR Mix HF
- Primers
- DNA template

5.5.3 Kit Platinum.

- Ultra-Pure Distilled Water (Marca: ThermoFischer)
- 10X PCR Buffer
- 10 mM dNTPs
- 50 mM MgCl₂
- Primers
- Platinum Taq Pol
- DNA template

5.5.4 Primers.

- nuoG-F: 5'-GGC GTG ATT GTT CTC GTT A-3'
- nouG-R: 5'-CAC GAC CAC GGC TAT CAA T-3'
- ITS-F: 325s = 5'-CTT CAG ATG ATG ATC CCA AGC CTT TTG GCG-3'
- ITS-R: 1100as = 5'- GAA CCG ACG ACC CCC TGC TTG CAA AGC-3'
- gltA-F (Round 1): 443f = 5'-GCT ATG TCT GCA TTC TAT CA-3'
- gltA-R (Round 1): 1210r = 5'-GAT CYT CAA TCA TTT CTT TCC A-3'
- gltA-F (Round 2): 781f = 5'-GGG GAC CAG CTC ATG GTG G-3'
- gltA-R (Round 2): 1137r = 5'-AAT GCA AAA AGA ACA GTA AAC A-3'

5.5.5 Materiales y equipos.

- Micropipetas de 0.5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl.
- Tubos eppendorf de 0.2ml.
- Termociclador BioRad.

5.6 Electroforesis en gel de Agarosa

- Cámara de electroforesis (BioRad)
- Fuente de poder
- Cables conectores positivo y negativo
- Buffer TBE 1X
- Agarosa (Ultra Pure)
- Peine
- SYBER SAFE
- Blue Orange Dye, 6X
- Balanza
- Microondas
- Parafilm
- Amplicones (nuoG-F / nuoG-R, ITS-F / ITS-F, gltA-F (Round 2) / gltA-R (Round 2))

5.7 Secuenciamiento

- Amplicones (nuoG-F / nuoG-R)
- Amplicones (ITS-F / ITS-R)

6. MÉTODOS

6.1 Análisis taxonómicos de especímenes

6.1.1 Sitios de muestreo.

Se eligieron los siguientes sitios de muestreo:

- Viviendas antiguas de adobe (las fisuras de las paredes dentro de las casas son muy favorables como criaderos para los flebótomos), viviendas construídas de tabla/tablonces (los CDC atraerían los flebótomos de afuera) y sus peridomicilios
- Zonas de bosque y cafetales cercanos a estas viviendas.

6.1.2 Toma de muestras.

Para coleccionar cada espécimen se utilizaron los siguientes métodos:

- **Trampas de luz CDCs** .- Estas trampas se colocaron a 0.5 metros del suelo en los dormitorios al interior de viviendas, en cafetales o frutales ubicados en el peridomicilio, y en bosque secundario o primario. Las trampas se instalaron, durante los días de muestreo, a las 6pm y las muestras se recogieron a las 6am del siguiente día en fundas de colección (Figura No.7)
- **Trampa Mosquito Magnet**. - Esta trampa se instaló siempre en el peridomicilio a las 10pm y fue recogida a las 8am del día siguiente (Figura No.8).
- **Cebo humano**. - Se realizaron colectas con equipo de cebo humano protegido. Se utilizaron camisas de manga larga y protegiendo manos y cara descubiertas con malla (Figura No.9). Los flebótomos se capturaron con tubos o aspiradores sobre la ropa o malla.

Una vez que los especímenes fueron capturados, se sacrificaron colocando las muestras en una congeladora a -20 C° y depositaron en envases llenos de alcohol al 70% con sus respectivas etiquetas. Las muestras fueron almacenadas en alcohol al 70% en una refrigeradora a 4 C° hasta que fueron procesadas.

6.1.3 Separación de muestras.

Con la ayuda del estereoscopio y pinzas entomológicas se separaron a los flebótomos (Diptera:Psychodidae) machos y hembras en tubos eppendorf individuales de 1.5ml. Estos tubos se llenaron con Etanol al 70% y se almacenaron a -20°C .

6.1.4 Montajes.

Para este estudio, se montaron solamente las hembras siguiendo la metodología a continuación:

- Método 1.- Cada individuo se colocó en una gota de Etanol al 70% sobre una lámina portaobjetos. Con la ayuda de agujas nuevas-estériles, se cortaron los tres últimos segmentos abdominales, la cabeza y un ala; el resto del cuerpo se almacenó en tubos eppendorf de 1.5ml llenos de Etanol al 70% y se guardó a -20°C . Se añadió dos gotas de solución Marc André a las partes del cuerpo que se cortó, se esperó 10 segundos, para posteriormente someter al calor del mechero, durante 5 segundos, para la clarificación de las estructuras. En una nueva placa portaobjetos se colocó una gota de Goma Cloral en donde se sumergieron las tres partes cortadas y clarificadas. La cabeza se ubicó con los ojos hacia abajo, los tres últimos segmentos abdominales y el ala se colocaron junto a la cabeza. Una vez que se montaron las tres partes del cuerpo en la posición correcta en la gota de Goma Cloral, se cubrió con una placa cubreobjetos, presionando ligeramente (Young & Duncan, 1994).

- Método 2.- Se mantienen los mismos pasos del método anterior, sin embargo, se reemplaza la gota Etanol al 70% en la que se coloca a cada individuo, por una gota de Solución Salina. También se reemplazan la solución Marc André por Lactofenol y la Goma Cloral por Euparal y se omite el uso del mechero.

6.1.5 Identificación taxonómica.

Para la identificación se utilizaron las claves dicotómicas de Young & Duncan, (1994), que se basan en caracteres morfológicos. Cada placa se observó en el microscopio a 40x y la identificación se realizó principalmente en base a la forma, tamaño y características del cibario, los palpos, las espermateca y las alas.

6.2 Biología Molecular

6.2.1 Extracción de ADN.

La extracción de ADN de los flebótomos se realizó con el Kit de Qiagen Dneasy Blood and Tissue Mini Spin Column. Se realizaron un total de 58 extracciones de 58 pools de individuos organizados con códigos (Tabla No.2) y colocados en tubos eppendorf de 1.5ml. 46 pools fueron de 1 individuo, 11 pools de 5 y 1 pool de 2, de acuerdo a los sitios de colecta.

Para cada tubo se añadió 180 μ l de buffer ATL y se homogenizó la muestra usando un pistilo. La homogenización se inició con 60 μ l de buffer ATL para luego agregarse otros 120 μ l de ATL. Seguidamente, se añadió 20 μ l de proteinasa K, cada muestra se mezcló por 5 segundos en un vortex a baja velocidad, se dio un spin down y se incubó a 56°C toda la noche.

Al siguiente día, se agregó 200 μ l de buffer AL, se mezcló por 5 segundos en un vortex a baja velocidad, se dio un spin down y se incubó a 56°C por 30 minutos. A cada tubo se añadió 200 μ l de Etanol (100%), se mezcló por 5 segundos en un vortex a baja velocidad y se dio un spin down. En este punto se verificó que la muestra y el etanol estén mezclados completamente en una solución homogénea que fue transferida al interior de la columna DNeasy Mini spin, previamente colocada en un tubo de 2 ml

incluido por el kit y según las instrucciones del fabricante. A continuación, se centrifugó cada tubo a 8,000 rpm durante 2 minutos. Se descartó el líquido y el tubo de 2ml. Seguidamente se colocó la columna DNeasy Mini spin en un nuevo tubo de 2 ml (Incluido también en el kit), se añadió 500 µl de Buffer AW1 y se centrifugó por 2 minutos a 8,000 rpm. Se descartó el líquido y el tubo de 2ml y se colocó la columna DNeasy Mini spin en un nuevo tubo de colecta de 2 ml al que se añadió 500 µl de Buffer AW2. Se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm con el objetivo de secar la membrana de la columna del DNeasy Mini spin. Se descartó el líquido y el tubo de 2ml. Después, se colocó la columna DNeasy Mini spin en un tubo eppendorf de 1.5 esterilizado, y se colocó gota a gota **40 µl** (en pools de 5 flebotomos se usó hasta 50 µl) de Buffer AE directamente sobre la membrana DNeasy. Cada tubo se incubó a temperatura ambiente por 5 min, y luego se centrifugó por 2 minutos a 8,000 rpm para eluir el ADN. Finalmente, los tubos se rotularon y se almacenaron a -20°C.

6.2.2 Cuantificación de ADN.

La concentración y calidad de ADN se determinó con el uso de un espectrofotómetro Nanodrop 2000™. Para el uso de este equipo, inicialmente se activó el programa con 2µl de agua para PCR, se limpió el agua y se añadió 2µl de buffer AE como solución blanco. Posteriormente, se limpió el detector del equipo y se fue añadiendo 2µl de cada muestra.

6.2.3 Amplificación de ADN Mitocondrial de la NADH deshidrogenasa subunidad gamma.

Se amplificó una región de 346 pares de bases (pb) del gen mitocondrial NADH deshidrogenasa subunidad gamma. Se utilizaron para la amplificación de este

segmento los primers NuoG: Forward, 5'-GGC GTG ATT GTT CTC GTT A-3' y Reverse, 5'-CAC GAC CAC GGC TAT CAA T-3' (Colborn, et al., 2010). El procedimiento para la amplificación se estandarizó a un volumen final de 25µl, utilizando 1µl de ADN con la enzima Platinum Taq, Platinum High Fidelity y Flexi Promega. También se estandarizaron las condiciones de PCR.

6.2.4 Amplificación de ADN de la región ITS (Internal transcribed spacer).

Se amplificó un segmento de 480 pares de bases (pb) de la región ITS (Internal transcribed spacer) 16S-23S. Los primers que se utilizaron para la amplificación de este segmento fueron los diseñados por Billeter, et al. (2008): Forward 325s = 5'-CTT CAG ATG ATG ATC CCA AGC CTT TTG GCG-3' y Reverse: 1100as = 5'- GAA CCG ACG ACC CCC TGC TTG CAA AGC-3'. El procedimiento para la amplificación se estandarizó a un volumen final de 25µl, utilizando 1µl de ADN con la enzima Flexi Promega. También se estandarizaron las condiciones de PCR.

6.2.5 Amplificación de ADN Mitocondrial del gen de la enzima citrato sintasa (gltA).

Esta amplificación se hizo mediante nested-PCR. Para el Round 1, se amplificó una región de 350 pares de base (pb) del gen que codifica para la enzima citrato sintasa. Los primers que se utilizaron para la amplificación de este segmento fueron: Forward 443f = 5'-GCT ATG TCT GCA TTC TAT CA-3' y Reverse 1210r = 5'-GAT CYT CAA TCA TTT CTT TCC A-3' (Birtles & Raoult, 1996). El procedimiento para la amplificación se estandarizó a un volumen final de 25µl, utilizando 1µl de ADN con la enzima Flexi Promega. Para este round, se estandarizaron las condiciones de PCR.

Para el Round 2, se amplificó una región de 340 pares de base (pb) del gen que codifica para la enzima citrato sintasa. Los primers que se utilizaron para la amplificación de este segmento fueron: Forward 781f = 5'-GGG GAC CAG CTC ATG GTG G-3' y Reverse 1137r = 5'-AAT GCA AAA AGA ACA GTA AAC A-3' (Norman, et al., 1995). El procedimiento para la amplificación se estandarizó a un volumen final de 25µl, utilizando 1µl de ADN con la enzima Flexi Promega. Para este round, se estandarizaron las condiciones de PCR.

6.2.6 Electroforesis en gel de agarosa.

Para poder observar los resultados de las amplificaciones, se corrieron los amplicones en un gel de Agarosa al 2%. Para esto, se empezó armando la cámara de electroforesis según indicaciones del fabricante. Después, se pesó 2.5gr de Agarosa Ultra Pure (Invitrogen) y se agregó a 125ml de solución TAE 1X previamente colocada en un matraz Erlenmeyer. Se llevó el matraz al microondas y se calentó por 5 periodos de 30 segundos, cada vez que finalizaba un periodo se agitaba el Matraz garantizando la mezcla homogénea de la Agarosa con el TAE 1X. Una vez que la Agarosa se disolvió totalmente, se dejó enfriar por 2 minutos. A esto se agregó y mezcló 4µl de SYBER SAFE, se agitó y vertió toda la solución de Agarosa sobre el porta-geles que forma parte de la cámara de electroforesis BioRad. Inmediatamente, se sumergió el peine para formar los pocillos y se dejó solidificar durante 30 minutos. Luego, se colocó el porta-geles en la cámara y se lo cubrió totalmente con TAE 1X. Para cargar las muestras amplificadas con la enzima Platinum Taq y Platinum High Fidelity, se tomó 10µl de la muestra amplificada y se mezcló con 2µl de Loading Blue Orange Dye, 6X y se agregó en los pocillos. La carga de las muestras amplificadas con la enzima Flexi

Promega se hizo de manera directa ya que este kit ya cuenta con loading buffer incorporado, también se cargaron 10µl de muestra. Cada gel contó con su Ladder respectivo. A continuación, se colocó la tapa de la cámara y se conectaron los polos positivo y negativo a la fuente de poder para empezar la corrida. La electroforesis se corrió a 80V durante 60 minutos (Irwin, 2001). Al terminar la corrida, se sacó el gel y se tomó una fotografía usando un Fotodocumentador BioRad.

6.2.7 Secuenciamiento.

Se seleccionó para secuenciar a 5 muestras positivas. Para ello, se utilizaron 17µl de los amplicones (positivos en gel de agarosa) resultantes de los primers nuoG para la detección del gen mitocondrial NADH deshidrogenasa subunidad gamma los que fueron enviados a la empresa privada Functional Biosciences, localizada en Estados Unidos para el secuenciamiento correspondiente. Adicionalmente, se secuenciaron amplicones (positivos en gel de agarosa) resultantes de la amplificación con los primers para la región ITS. Se solicitó que la secuenciación sea en ambos sentidos de los productos crudos del PCR.

6.2.8 Análisis del secuenciamiento.

Las secuencias fueron limpiadas y alineadas en el software MEGA 7.0.21 (Kumar, et al., 2015). Se generó la secuencia consenso y se realizó un BLAST (NCBI, 1998) para confirmar la identidad de las muestras positivas.

7. RESULTADOS

7.1 Clarificación y montaje

Para este proceso, se logró estandarizar un nuevo método en el que se utiliza solución salina para la disección de individuos, lactofenol para la clarificación y goma cloral para el montaje (Tabla No.3).

7.2 Análisis taxonómicos de especímenes

En este estudio se colectaron un total de 310 flebótomos (Diptera:Psychodidae) encontrados en las zonas de Isimanchi, Río Mayo y Maniales en la provincia de Zamora Chinchipe. De todos los especímenes, el 95.16% (295 individuos) fueron hembras y el 4.84% (15 individuos) machos. De las hembras colectadas, el 40.97% (127 individuos) correspondió a hembras alimentadas de sangre y el 59.03% (168 individuos) restante a hembras sin alimentar (Figura No.10).

Se diseccionaron, identificaron y montaron en placa porta objetos un total de 114 especímenes. En base a la clave de Young & Duncan (1994) se identificó la presencia de solo 3 especies en las zonas de estudio: *Lutzomyia robusta* (94.74%), *Lutzomyia maranonensis* (4.38%), y *Lutzomyia castanea* (0.88%) (Figura No.11). La especie predominante identificada es *Lutzomyia robusta* (Figura No.12). La información de cada individuo (ubicación, especie, fecha, tipo de trampa y sitio de colecta) se digitalizó en una matriz presentada en la Tabla No.4.

En la zona de Isimanchi, se identificaron a 2 especímenes de *Lu. robusta* y 2 de *Lu. maranonensis*. En la zona de Río Mayo, se identificaron 85 (95.51%) individuos de *Lu. robusta*, 3 especímenes (3.37%) de *Lu. maranonensis* y 1 espécimen (1.12%) de *Lu.*

castanea. En la zona de Maniales, el 100% de individuos (21 especímenes) fueron *Lu. robusta* (Figura No.13).

7.3 Análisis de Trampas

El número de especímenes colectados variaron de acuerdo al tipo de trampa que se utilizó en los sitios de estudio. Del total de 114 individuos identificados, con la trampa CDC se capturó el 6.14%, con la trampa Mosquito Magnet el 15.79% y con el cebo humano protegido el 78.07% (Figura No.14)

7.4 Biología Molecular

7.4.1 Cuantificación de ADN.

En la Tabla No.5, se presentan los datos obtenidos de la cuantificación del ADN extraído de cada muestra. Todas las muestras presentan concentraciones superiores a 3 ng/μl, así como rangos 260/280 en general superiores a 1.

7.4.2 Estandarización de protocolos.

Para la amplificación del ADN Mitocondrial de la NADH deshidrogenasa subunidad gamma, se utilizaron tres controles positivos de *Bartonella* spp. Para uno de estos tres controles se hicieron diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000. Todos estos controles se amplificaron con la enzima Platinum Taq, Platinum High Fidelity y con la Flexi Promega (Figura No.15).

Para la amplificación de ADN de la región ITS, se utilizó un control diluido en 5pg, 0.5pg y 0.05pg. Estos controles se amplificaron con la enzima Flexi Promega (Figura No.16)

Para la amplificación de ADN del gen de la enzima citrato sintasa, se utilizó un control diluido en 0.5ng, 0.05ng, 0.005ng, 0.05pg y Barto2. Estos controles se amplificaron con la enzima Flexi Promega (Figura No.17)

7.4.3 Amplificación.

Se examinaron 58 pools de ADN de flebotomos para la detección de la región NADH deshidrogenasa subunidad gamma, de la región ITS y de el gen de la enzima citrato sintasa.

Para el gen de la NADH deshidrogenasa subunidad gamma, del ADN Mitocondrial se amplifico un segmento de 346 pares de bases correspondiente a una banda positiva (utilizando la estandarización con Platinum Taq), para las muestras codificadas en la Tabla No.2, como A11 y A18 (Figura No.18). Cada una de las muestras corresponde a pools de 5 flebotomos de la especie *Lu. robusta* colectada en la zona de Río Mayo, Parroquia de Chito, Cantón Zamora, Provincia de Zamora Chinchipe. El resultado positivo fue corroborado mediante secuenciación determinándose la presencia de *Bartonella* spp., en las muestras positivas.

Para la región ITS, se amplificó un segmento de aproximadamente 480 pares de bases correspondiente a una banda positiva para las muestras codificadas en la Tabla No.2, como A30, A39 y A44 (Figura No.19 y Figura No.20). La muestra A30 corresponde al ADN extraído de un solo individuo de la especie *Lu. castanea*, la muestra 39 y 44 corresponden a un pool de ADN extraído de un solo individuo de la especie *Lu. robusta*. Cada una de las muestras fueron colectadas en la zona de Río Mayo, Parroquia de Chito, Cantón Zamora, Provincia de Zamora Chinchipe

Para el gen de la enzima Citrato Sintasa (Round 2), se amplificó un segmento de aproximadamente 350 pares de bases correspondiente a las bandas positivas, en las muestras codificadas en la Tabla No.2 como A18, A30, A39 y A44 (Figura No.21).

De todas las muestras positivas, la codificada como A11 es de un pool de cinco individuos de *Lu. robusta*. Las muestras codificadas como A18, A39 y A44; corresponden a pools de un individuo de *Lu. robusta*. Y, la muestra codificada como A30 corresponde a un pool de un individuo de la especie *Lu. castanea*. Todas las muestras positivas fueron colectadas en la zona de Río Mayo, Parroquia de Chito, Cantón Zamora, Provincia de Zamora Chinchipe.

7.4.4 Secuenciación.

De la amplificación del gen de la NADH deshidrogenasa subunidad gamma, se secuenciaron las muestras positivas A11 y A18; del gen de la región ITS se secuenciaron las muestras positivas A30, A39 y A44.

Cada una de las muestras secuenciadas se limpiaron y alinearon, generando la secuencia consenso con la que se realizó una búsqueda BLAST. La muestra A11, dio un resultado de solapamiento con el genoma completo de *Bartonella bacilliformis* del 99% (Morgulis, et al., 2008), lo que confirma la infección con esta especie bacteriana (Tabla No.6). La variación del 1% corresponde a una mutación en el punto 837,037 en donde una Guanina (secuencia disponible en el GenBank), está reemplazada por una Timina (muestra secuenciada). Como se muestra en la Figura No. 22, la mutación (SNP) está localizada en el codón de traducción (segunda base), cambiando el aminoácido de Arginina a Leucina (Szymański & Barciszewski, 2007).

La muestra A18, también dio un resultado de solapamiento con el genoma completo de *Bartonella bacilliformis* del 99% (Morgulis, et al., 2008), lo que confirma la detección de esta bacteria (Tabla No.6). La variación del 1% se da por una mutación en el punto 837,037 donde una G (secuencia disponible en el GenBank), se reemplaza por una T (muestra secuenciada). Como se muestra en la Figura No.23, la mutación (SNP) está localizada en el codón de traducción (segunda base), cambiando el aminoácido de Arginina a Leucina (Szymański & Barciszewski, 2007).

La muestra A30, se solapó en un 93% con el genoma completo de *Bartonella bacilliformis* (Morgulis, et al., 2008) publicado en GenBank. Sin embargo, su porcentaje de "Currie cover" es considerablemente bajo (Tabla No.6), lo que no justifica el análisis de las mutaciones de esta muestra, ni confirma la infección de la bacteria en *Lu. castanea*.

La muestra A39, se solapó en un 91% con la región ITS (disponible en NCBI) de la cepa B33695 de *Bartonella bovis* (Tabla No.6).

La muestra 44, se solapó en un 99% con la secuencia de los genes ITS1 (disponible en NCBI) de *Bartonella bacilliformis* (Morgulis, et al., 2008), confirmando así la identidad de la especie bacteriana (Tabla No.6). La variación del 1% se da por cuatro mutaciones que se indican en la Figura No.24.

8. DISCUSIÓN

8.1 Método para disección, clarificación y montaje

Se desarrolla una modificación al método de procesamiento y montaje en placa de flebotomos descrito en Young & Duncan (1994), modificado en base a las

experiencias del LEMMT y NAMRU-6. Se utiliza solución salina, en lugar de alcohol, para el proceso de disección de individuos, lo que es una ventaja porque el alcohol tiende a evaporarse muy rápido y dificulta diseccionar varias muestras a la vez, invirtiendo mayor tiempo. La solución salina, es un compuesto compatible con cualquier material biológico, que no se evapora, (García, et al., 2001) permitiendo que el laboratorista ahorre tiempo.

Para el proceso de clarificación con solución Marc André, una vez que las muestras estén sumergidas en el reactivo, se utiliza fuego directo a las placas portaobjetos mediante el mechero. Esto, y el fuerte olor (producto del Ácido Acético Glacial) representa un riesgo potencial para el laboratorista, además significa mayor tiempo en la clarificación de cada individuo. En este sentido, el reemplazar la solución Marc André por Lactofenol, permite clarificar varias muestras a la vez y, con la protección de guantes de látex, se pueden mitigar los riesgos de este reactivo. El Lactofenol, está compuesto por fenol y ácido láctico, las propiedades del fenol permiten preservar las estructuras biológicas cortadas y el ácido láctico las clarifica. Por las razones expuestas, se ha estandarizado el protocolo con el uso de Lactofenol (Negroni, et al., 2008).

Convencionalmente, si se utiliza lactofenol en la clarificación de muestras, es recomendable montarlas con medio Euparal (Pritt, 2012). Sin embargo, se ha probado en el laboratorio, que las espermatecas y dientes de los especímenes montados con medio Euparal, pierden legibilidad con el tiempo, a diferencia de la solución Goma Cloral, que mantiene las estructuras claras y legibles por largo tiempo.

8.2 Taxonomía

La especie más común en la zona de estudio es *Lu. robusta*, fue encontrada tanto en bosque secundario como dentro de las habitaciones de las viviendas. En un análisis por zonas, la Figura No.13 representa que para Isimanchi, los porcentajes son distribuidos por igual entre *Lu. robusta* y *Lu. maranonensis*, sin embargo, se basa en solamente 4 especímenes, por lo que esta cantidad no es representativa para sugerir otras conclusiones. Tanto en Río Mayo como en Maniales, la cantidad de *Lu. robusta* es mayor en las colectas entomológicas y es seguida de *Lu. maranonensis*. El encontrar estas dos especies predominando en el área de estudio, coincide con los datos reportados por Cáceres, et al., (1997) que, en las provincias fronterizas Peruanas de Jaén, San Ignacio y Utcubamba registra 1602 individuos de *Lu. robusta* (especie predominante) y 888 de *Lu. maranonensis*.

La proporción de estos datos podría sugerir que estas especies se distribuyen de igual forma en las zonas fronterizas de ambos países, porque son lugares cercanos que poseen un clima subhúmedo Subtropical con precipitaciones mayores a 1000 mm (Cañadas, 1993). Adicionalmente, reportes de Galati, et al., (1995), ya indican la presencia de *Lu. robusta* en la provincia de Zamora Chinchipe - Ecuador para el año de 1995.

8.3 Análisis de Trampas

Como se observa en la Figura No.14, el mayor número de individuos colectados se obtuvo mediante el método de colecta de cebo humano protegido, seguido de la trampa Mosquito Magnet y finalmente de la trampa CDC.

El cebo humano protegido aún resulta ser el mejor método de captura, ya que los insectos utilizan la microbiota humana como alimento, además son atraídos por señales químicas y físicas como el calor, humedad y sudor. También, los receptores del palpo maxilar, detectan el dióxido de carbono de la exhalación humana (Verhulst, 2010).

La trampa Mosquito Magnet es una trampa sofisticada que utiliza una reacción catalítica para convertir el gas propano en CO₂ y adicionalmente usa atrayentes químicos como el Octenol (Rubio, et al., 2014). Se ha propuesto que por el hecho de emitir CO₂ y utilizar un atrayente químico, es la trampa más cercana al cebo humano en términos de efectividad (V. Zorilla, Comm. Personal). A pesar de que en este estudio no se pretendía evaluar la efectividad de las trampas usadas y por ende no se utilizaron los diferentes métodos de colección simultáneamente y por el mismo periodo de tiempo, las observaciones en el campo sugieren que el cebo humano protegido sigue siendo el método más eficiente para coleccionar vectores. La trampa CDC ha sido ampliamente usada para colecta de Dípteros Nematóceros de importancia médica y vectores (Kline, et al., 2011). Utiliza la luz como atrayente, pero puede incorporarse hielo seco adicionalmente como atrayente que emita CO₂ o sachets que por una reacción química produzcan CO₂. Sin embargo, su uso en zonas remotas se dificulta, el hielo seco es difícil de conseguir y se evapora rápidamente y el uso de sachets más especializados es costoso, por lo que no fueron usados en este estudio (Webb, 2004). La trampa CDC, sin estas adiciones, es menos efectiva pero aun útil como un método fácil de usar para el monitoreo de las especies de flebotomos y vectores presentes especialmente en zonas remotas. Otras trampas que utilicen cebo humano que pueda estar más protegido están en desarrollo y evaluación para una más

eficiente colecta entomológica. Por ejemplo, la trampa electrocutadora de mosquitos (Mosquito Electrocuting Trap MET) desarrollada por la Universidad de Glasgow está siendo evaluada para la colecta de otros vectores como *Aedes aegypti* en otro proyecto de investigación en el LEMMT. Otros estudios a futuro pueden evaluar y comparar todas estas trampas para un más eficiente y seguro monitoreo de vectores en estas y otras zonas rurales, remotas y distantes del Ecuador.

8.4 Amplificación de muestras

8.4.1 Primes nuoG (región NADH deshidrogenasa subunidad gamma)

Se seleccionó el par de primers nuoG diseñados por Colborn, et al., (2010), para la detección de *Bartonella* spp. ya que diversos estudios indican que estos primers son sensibles y específicos. Por ejemplo, Gómez, et al., (2015) han detectado *Bartonella chomelii* en ganado español con estos marcadores; adicionalmente, Colborn, et al., (2010) han detectado *Bartonella henselae* y *Bartonella quintana* en mamíferos y vectores; y Billeter, et al., (2011) han detectado a *Bartonella quintana* y *Bartonella elizabethae*. En este estudio, 2 muestras (A11 y A18) son positivas para *Bartonella* spp. usando estos primers, como se muestra en la Figura No.18. En el gel, las bandas de 346 pares de bases, se muestran tenues en relación al control positivo. Esto podría explicarse pues el control positivo que se utilizó es ADN extraído de un cultivo positivo para *Bartonella bacilliformis*, y por ende más concentrado que las muestras A11 y A18, que corresponden al ADN bacteriano de pools de 5 flebotomos de los cuales al menos uno estuvo infectado. Además, Bai, et al., (2015), sugiere que los primers utilizados en este método son de poca sensibilidad. Considerando estos antecedentes, se usaron primers para la región ITS que fueron también estandarizados.

8.4.2 Primes ITS (Secuencia Intergénica 16S-23S del ARNr)

Los primers diseñados por Billeter, et al. (2008), son altamente sensibles para la detección de *Bartonella* spp. Mediante esta metodología, Jensen, et al., (2000), detecta a *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* y *Bartonella vinsonii* en varios cultivos.

En este estudio, las muestras A30, A39 y A44; previamente negativas con los primers nuoG, se muestran claramente positivas (tamaño de 490 pb) como se visualiza en las Figuras No.19 y 20.

En el pasado, varios laboratorios han investigado diferentes métodos de diagnóstico molecular para la rápida identificación de *Bartonella* spp., sus estudios se basan en análisis mediante secuenciación o análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP's) de genes amplificados por PCR, tales como el gen de ARNr 16S, gen de la región ITS (16S-23S ARNr), el gen Citrato Sintasa, la riboflavina sintasa, entre otros. De estos análisis, se concluyó que el uso de primers de la región ITS, es uno de los métodos más prácticos para detectar de *Bartonella* spp., y los amplicones que se generan varían en tamaño de acuerdo a la identidad de la bacteria por lo que ayudan a su identificación (Maggi & Breitschwerdt, 2005). Como se evidencia en este estudio, estos primers pueden ser más sensibles que los nuoG, ya que se detectó infección positiva en muestras que fueron negativas para los primers nuoG. Para confirmar todos los resultados encontrados, se utiliza una metodología más, el Nested-PCR.

8.4.3 Nested-PCR

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, 2017), en colaboración con NAMRU-6 (Naval Medical Research Center Unit Six) recomiendan el uso de un Nested-PCR para la mejor detección e identificación de especies de *Bartonella*. Se utiliza una doble amplificación, los primers *gltA* diseñados por Birtles & Raoult (1996) para el primer proceso de amplificación, y los primers diseñados por Norman, et al., (1995). para la segunda amplificación. En este estudio, las muestras A18, A30, A39 y A44 se muestran positivas (Tamaño de 350 pb) usando el procedimiento Nested como se visualiza en la Figura No.21. Este procedimiento se realizó para confirmar los resultados obtenidos de la amplificación con los primers *nuoG* y de la región ITS. El tener un procedimiento de re amplificación, hace que los resultados sean más sensibles, disminuyendo la probabilidad de que los primers se unan y amplifiquen a regiones inespecíficas (Snounou, 1993).

La muestra A 11 previamente positiva según los primers *nuoG* fue negativa con el procedimiento Nested. Esto pudo haberse debido a que al ser la primera muestra positiva detectada, fue utilizada constantemente pasando por procesos de descongelamiento y congelamiento reiterados, que pudieron haber afectado a la integridad del ADN (Kirby, 1993).

La detección de diferentes muestras usando diferentes primers necesita ser evaluada más exhaustivamente. Es posible que la presencia de inhibidores en las muestras afecte al proceso ya que la distinta sensibilidad de los protocolos podría detectar a los inhibidores de diferente forma, donde estos actúen inhibiendo a la actividad de la Taq Polimerasa o secuestrando el $MgCl_2$, lo que no permite la visualización de bandas positivas. Por lo expuesto, el Nested-PCR sería el mejor

método de detección molecular, pues al realizar un proceso de re amplificación, podría diluir a los posibles inhibidores, y ayudar en la detección de ADN en concentraciones más bajas (Birtles, et al., 2002). Para evitar la presencia de inhibidores en las muestras de ADN, se podría mejorar el procedimiento de extracción utilizando el kit con perlas magnéticas que, además de utilizar soluciones a pH específicos, utiliza un magneto que atrae a las perlas para separarlas de las soluciones suspendidas. En este caso, se añade a la solución de lisis, una solución amortiguadora a pH ácido permitiendo que las perlas se carguen positivamente, lo que favorece la unión del ADN. Con esto, los inhibidores (que tienen baja afinidad por las perlas) son eliminados con soluciones de lavado (Castillo, 2014).

8.5 Secuenciación

8.5.1 *Bartonella spp.*

El análisis de las secuencias confirma la infección de *Lu. robusta* con *Bartonella bacilliformis*, adicionalmente muestra infección con *B bovis* como se pueden ver en las bandas positivas confirmadas con Nested-PCR en la Figura No.21. Se confirma la presencia de la bacteria *B.bacilliformis* en las muestras A11, A18 y A44; la búsqueda BLAST señala una identidad del 99%. La muestra A30, sin embargo, no representa un resultado concluyente ya que al realizar un BLAST, a pesar de que tiene una identidad de 99% con *B.baciliformis*, el Query cover es de 36%. Se sugeriría repetir la secuenciación de esta muestra.

El Ecuador, ha sido reconocido como un país endémico para bartonelosis. Cooper, et al., (1995) ha reportado 18 casos de la Enfermedad de Carrión entre los años de 1995 y 1996. El director del hospital de Zumba, muestra datos no publicados

del registro histórico de casos de bartonelosis, con 39 casos desde septiembre 1995 hasta mayo 2005 (Olalla, 2013). Los pocos estudios que se han realizado se han enfocado en la enfermedad. Hasta donde llega nuestro conocimiento, en Ecuador no se ha detectado a *B. bacilliformis* (agente patógeno) en los vectores flebótomos, ni la presencia de *Lu. verrucarum* y *Lu. peruensis*, vectores incriminados de la Enfermedad de Carrión (Alexander, 1995). El presente estudio detecta e identifica molecularmente por primera vez en el Ecuador, la presencia de *B. bacilliformis* en flebótomos. Los resultados sugieren que este patógeno se encuentra circulando en zonas de bosque adyacentes a zonas pobladas de la localidad de Maniales, en la provincia de Zamora Chinchipe. Es posible que la ausencia de casos humanos reportados con esta enfermedad en las últimas décadas se deba a; (1) la presencia de casos subclínicos que no son detectados por el sistema médico de la zona (2) o que la Fiebre de Oroya (primera fase de la enfermedad) esté siendo confundida con una fiebre común, y que la Verruga Peruana (segunda fase de la enfermedad) se confunda con tumores cutáneos como; granuloma piógeno, varicela, entre otros (González, 2007). Adicionalmente, ante la ausencia de malaria en la zona, es incierto si se mantiene en los sistemas médicos la obligatoriedad de obtener muestras de sangre de todo paciente febril admitido y es una zona remota con difícil acceso y logística (3) la infección se restrinja al vector en zonas selváticas. El ciclo natural de *B. bacilliformis* es poco conocido y de lo que se conoce el hombre es el reservorio de la enfermedad (Angkasekwina, et.al., 2014) lo que haría poco probable que el patógeno pueda mantenerse en flebótomos infectados en zonas de bosque sin contacto con el hombre. Más estudios son necesarios para investigar otros posibles reservorios y la dinámica de transmisión de esta especie bacteriana.

La secuencia de la muestra A39 confirma la presencia de *Bartonella bovis*, con una búsqueda BLAST que indica una identidad del 91%. Esta bacteria ha sido aislada de ganado vacuno con endocarditis. Un estudio publicado por Maillard (2007), sugiere a *B. bovis* como potencial patógeno de la enfermedad; al realizarse una prueba IFA de válvulas vegetativas, se muestra la presencia de anticuerpos frente al antígeno de *B.bovis*. Además en dos casos de endocarditis bovina (de un total 22), se detectó mediante PCR la presencia de un gen *gltA* con identidad del 99% igual a un gen registrado en el GenBank de *B.bovis*. La bacteria ha sido detectada principalmente en ejemplares europeos, sin embargo, Saisongkorh, et al., (2009), detecta la presencia de esta bacteria en Sudamérica en Guayana Francesa. De confirmar esta bacteria como agente patógeno de endocarditis, la detección en Ecuador significaría un riesgo potencial de la transmisión a ejemplares bovinos.

8.5.2 *Lutzomyia robusta*

Estudios en el pasado incriminan a *Lu. peruensis* y *Lu. verrucarum*, como vectores de *B.bacilliformis* (Alexander, 1995). Sin embargo, el estudio publicado por Minnick (2014), sugiere a *Lu. robusta* y *Lu. maranonensis*, como potenciales vectores. La ultima incriminación se basa en que estas especies han sido capturadas de manera abundante en las provincias Peruanas de Jaén, San Ignacio y Utcubamba (donde la presencia de *Lu. peruensis* y *Lu. verrucarum* es baja) en zonas identificadas como endémicas para casos confirmados de la Enfermedad de Carrión. Hasta lo que conocemos este estudio es el primer reporte que confirma molecularmente la infección natural de *B. bacilliformis* en *Lu. robusta* aportando a la incriminación de esta especie como vector de la enfermedad. Futuros estudios de la transmisión de esta

bacteria en esta especie de flebótomo de manera experimental, corroborarían la incriminación de esta especie como vector (Minnick, et al., 2014).

9. CONCLUSIONES

- Este estudio reporta por primera vez en el Ecuador, la infección de *Bartonella bacilliformis* en *Lutzomyia robusta*.
- Se han estandarizado protocolos para la detección de tres genes (NADH, ITS, Citrato Sintasa) de *Bartonella* spp. en muestras de flebótomos.
- Tres especies de flebótomos están presentes en la zona de estudio; *Lu. robusta*, *Lu. maranonesis* y *Lu. castanea*.
- El estudio confirma la presencia de *Lutzomyia robusta* dentro de las viviendas y su comportamiento antropofílico.
- Se reporta la infección de *Lutzomyia robusta* con *Bartonella bovis*.

10. RECOMENDACIONES

- Ampliar la investigación en diferentes épocas del año para estudiar estacionalidad, la posible dinámica de transmisión de la enfermedad y evidenciar casos humanos activos o subclínicos.
- Ampliar el estudio para explorar la infección de *B. bovis* en flebótomos y sus posibles implicaciones en bovinos.
- A las autoridades de salud de la zona sobre la importancia del monitoreo pasivo de la enfermedad y de la implementación de monitoreos entomológicos.

- A las autoridades de salud sobre la importancia de difundir información a la población sobre las enfermedades transmitidas por flebótomos y medidas para prevenir su presencia dentro de las viviendas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, B. (1995). A review of bartonellosis in Ecuador and Colombia. *Am J Trop Med Hyg.*, 52(4):354-9.
- Antero, L. (2012). *Mosquito Magnet after Running for 8 Days*. Recuperado desde: <https://www.youtube.com/watch?v=gHTc8tusQ94>. (2017-05-01).
- Angkasekwina, N., Atkins, E.H., Jhonson, R.N., Grieco, J.P., Wei Mei Ching., & Chien Chung Chao. (2014). Rapid and Sensitive Detection of *Bartonella bacilliformis* in Experimentally Infected Sand Flies by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of the Pap31 Gene. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Volume 8, 3342.
- Arias, J., Lieberman, P. H., & Erlandson, A. (1986). Histology, immunohistochemistry, and ultrastructure of the verruga in Carrión's disease. *Am J Surg Pathol* 10: 595–610.
- Bai, Y., Recuenco, S., Gilbert, A. T., Osikowicz, L. M., Gómez, J., Rupprecht, C., & Kosoy, M. Y. (2012). Prevalence and Diversity of *Bartonella* spp. in Bats in Perú. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 87(3):518–523.
- Bai, Y., Rizzo, M. F., Alvarez, D., Moran, D., Peruski, L. F., & Kosoy, M. (2015). Coexistence of *Bartonella henselae* and *B. clarridgeiae* in populations of cats and their fleas in Guatemala. *Journal of Vector Ecology*, 40(2):327-332.
- Beati, L., Cáceres, A.G., Lee, J.A. & Munstermann, L.E. (2004). Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *Internat. J. Parasitol.* 34: 225-234.
- Bejarano, E. (2006). Lista actualizada de los Psicódidos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. *Folia Entomol*, 45(1): 47-56.
- Billeter, S. A., Levy, M. G., Chomel, B. B., & Breitschwerdt, E. B. (2008). Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Medical and Veterinary Entomology*, 22:1-15.
- Billeter, S., Miller, M. K., Breitschwerdt, E. B., & Levy, M.G. (2008). Detection of Two *Bartonella tamiiae*-Like Sequences in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae)

Using 16S-23S Intergenic Spacer Region-Specific Primers. *Med. Entomol.* 45(1): 176-179

- Billeter, S.A., Cáceres, A., Gonzales, J., Lina, D., & Kosoy, M. (2011). Molecular Detection of *Bartonella* Species in Ticks From Peru. *J. Med. Entomol.*, 48(6):1257-1260.
- Birtles, R. J., & Raoult, D. (1995). Comparison of partial citrate synthase gene (*gltA*) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. *Int J Syst Bacteriol.* 46: 891-897.
- Birtles, R. J., Canales, J., Ventosilla, P., Alvarez, E., Guerra, H., Llanos-Cuentas, A., raoult, D., Doshi, N., & harrison, T. G. (1999). Survey of *Bartonella* species infecting intradomicillary animals in the Huayllacallan valley, Ancash, Perú, a region endemic for human bartonellosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60 (5):799-805.
- Birtles, R.J., Norman, K.F., Palmira, C., Cáceres, A.G., Sánchez, E., Vizcarra, H., & Raoult, D. (2002). Identification of *Bartonella bacilliformis* Genotypes and Their Relevance to Epidemiological Investigations of Human Bartonellosis. *J Clin Microbiol*, 40(10): 3606–3612.
- Blazes, D. L., Mullins, K., Smoak, B. L., Jian, J., Canal, E., Solorzano, N., Hall, E., Meza, R., Maguina, C., Myers, T., Richards, A. L., & Laughlin, L. (2013). Novel *Bartonella* Agent as Cause of Verruga Peruana. *Emerging Infectious Diseases*, 19 (7):1111-1113.
- Brenner, D. J., O'Connor, S. P., Hollis, D. G., Weaver, R. E., & Steigerwalt, A.G. (1991). Molecular characterization and proposal of a neotype strain for *Bartonella bacilliformis*. *J. Clin. Microbiol*, 29:1299–1302.
- Burstein, Z., & Mayta, T. P. (2007). In defense of the title as “Carrión Disease” for the human Bartonellosis caused by *Bartonella bacilliformis*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 24(2):103-106.
- Cáceres, A.G., & Villaseca, C. (2002). Manual de procedimientos de identificación de vectores de leishmaniosis y enfermedad de Carrión. Lima, Peru: Instituto Nacional de Salud.
- Calero, G. et al. (2005). Clinical and epidemiologic study of Bartonellosis in Ecuador. *Dermatol Peru*, 15(2):132-136
- Calvopiña, M., Calvopiña, R., & Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99(7): 663-672.

- Cañadas, L. (1983). *El mapa bioclimático y ecológico del Ecuador*. MAG-PRONAREG. Editores Asociados. Quito, Ecuador. 210 p.
- Castillo, J.M.A. (2014). Tema: Extracción de ADN. Recuperado desde: <https://monitoreoybioseguridad.files.wordpress.com/2014/02/extraccion-de-adn.pdf>. (2017-05-17).
- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). PCR protocol for nested *gItA*. *NAMRU Information*.
- Chian, C. A., Arrese, J. E., & Piérard, G. E. (2002). Skin manifestations of *Bartonella* infections. *International Journal of Dermatology*, 41:461-466.
- CIPA (Computer-aided Identification of Phlebotomine sandflies of America). (2013). Recovered site: <<http://cipa.snv.jussieu.fr/>>.
- Colborn, J.M. et al. (2010). Improved Detection of *Bartonella* DNA in Mammalian Hosts and Arthropod Vectors by Real-Time PCR Using the NADH Dehydrogenase Gamma Subunit (*nuoG*). *J Clin Microbiol*, 48(12):4630-3.
- Cooper, P., Guderian, R., Paredes, W., Daniels, R., Perera, D., Espinel, M., Valdez, M., & Griffin, G. (1996). Bartonellosis in Zamora Chinchipe province in Ecuador. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 90(3):241-3.
- Cuadra, M., & Cuadra, A. L. (2000). Enfermedad de Carrión: Inoculaciones de Seres Humanos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 61 (4):289-294.
- Dias, E.S., Fortes-Dias, C.L., Stiteler, J.M., Perkins, P.V. & Lawyer, P.G. (1998). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Lutzomyia longipalpis* laboratory populations. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 40 (1): 49-53.
- Flores, M. et al. (2006). *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) en un foco suburbano de leishmaniosis visceral en el Cañón del Chicamocha en Santander, Colombia. *Biomédica*, 26(1):109-20
- Flores, L. E. (2008). Estudios moleculares en *Bartonella bacilliformis* para el control de la enfermedad de Carrión. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12): 4630-4633.
- Galati, E. Q., Cáceres, A. G., & Le Pont, F. (1995). Description of *Lutzomyia* (*Pifanomyia*) *robusta* n. sp. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Peruvian Equadorean interandean areas. *Rev. Saúde Pública*, 29(2):89-99.
- Galati, E.A.B. (1995). Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera:Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol. Dir. Malariol. Saneamiento Ambient.* 35: 133-142.

- García, P., Maldonado, A., Díaz, R., Muñiz, J., & Rodríguez, A. (2011). Sustitución del uso de solución salina fisiológica como irrigante en el manejo de pacientes sépticos y quirúrgicos por solución electrolizada. *Revista Mexicana de Cirugía Bucal y Maxilofacial*, 7(2):46-52.
- Ghosh, K.N., Mukhopadhyay, J.M., Guzman, H., Tesh, R.B. & Munstermann, L.E. (1999). Interspecific hybridization and genetic variability of *Phlebotomus* sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*. 13: 78-88.
- Google. (s.f). *Google Maps Distancia de Namballe a Pucapamba*. Recuperado de: <https://www.google.com.ec/maps/@-4.9775771,-79.1099685,17z>. (2017-04-30).
- González, C., Maguiña, C., Heras, F., & Conde, L. (2007). Bartonellosis (Fiebre de la Oroya o Verruga Peruana) ¿Enfermedad ocupacional? *Med. segur. trab.*, 52: 209.
- Gómez, M. L., Lozano, A., Barandika, J. F., González, M. N., Rodríguez, I., García, A. L., & Gil, H. (2015). *Bartonella chomelii* is the most frequent species infecting cattle grazing in communal mountain pastures in Spain. *Appl Environ Microbiol*, 81(2):623-9.
- Hashiguchi, Y. (2001). Studies of New World Leishmaniasis and its transmission, with particular reference to Ecuador. Chapter 2: A global situation of leishmaniasis. *Research report series No 6: 8-11*.
- Huarcaya, E., Maguiña, C., Torres, R., Rupay, J., & Fuentes, L. (2004). Bartonellosis (Carrion's disease) in the pediatric population of Peru: an overview and update. *Braz J Infect. Dis.*, 8: 331-339.
- Irwin, N. & Janssen, K. (2001). *Molecular Cloning a laboratory manual*. 3era ed. Nueva York: Ferdowsi University of Mashhad.
- Kirby, L. T. (1993). *DNA Fingerprinting: An Introduction*. Oxford University: Front Cover.
- Kline, D.L., Hogsette, J., & Muller, G. (2011). Comparison of various configurations of CDC type traps for the collection of *Phlebotomus papatasi* Scopoli in southern Israel. *Journal of Vector Ecology*, 36(1): 212-218-
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Lewis, D.J., Young, D.G., Fairchild, G.B. & Minter, D.M. (1977). Proposal for a stable classification of the phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae). *Syst. Ent.* 2:319-332.

- Lynn, A.J., Cohnstaedt, L.W., Beati, L., Terán, R., León, R., & Munstermann, L.E. (2010). New records of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Ecuador. *Proc Entomol Soc Wash*, 112(1): 47–53.
- Maciej Szymański, M., & Barciszewski, J. (2007). The genetic code — 40 years on. *Acta Biochimica Polonica*, 54 (1):51–54.
- Maggi, R. G., & Breitschwerdt, E. B. (2005). Potential Limitations of the 16S-23S rRNA Intergenic Region for Molecular Detection of *Bartonella* Species. *J Clin Microbiol*, 43(3):1171–1176.
- Maguiña, C., Guerra, H., & Ventosilla, P. (2009). Bartonellosis. *Clin Dermatol*, 27: 271–280.
- Maillard, R., Petit, E., Chomel, B., & Jean, H. (2007). Endocarditis in Cattle Caused by *Bartonella bovis*. *Emerging infectious diseases*, 13(9):1383-5.
- Márquez, C. et. al. (2014). Enfermedad de Carrión. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*; 61 (4): 246-252
- Ministerio de Salud de Perú. (2001). *Enfermedad de Carrión (Bartonellosis) en el Perú*. Lima-Perú: Centro de Documentación del I.N.S / OGE.
- Minnick, M.F., Burt, E.A., Lima, A., Battisti, J.M., Lawyer, P.G., & Birtle, R.J. (2014). Oroya Fever and Verruga Peruana: Bartonelloses Unique to South America. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(7): e2919.
- Moo-Llanes, D. A., & Rebollar, E. A. (2009). *Diversidad y distribución geográfica de las especies de los géneros Brumptomyia y Lutzomyia en Quintana Roo, México*. Thesis for: Licenciatura. UADY.
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., & Schäffer, A. A. (2008). Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. *Bioinformatics* 24:1757-1764.
- Mullins, K. E., Hang, J., Jiang, J., Leguia, M., Kasper, M. R., Maguiña, C., Jarman, R. G., Blazes, D., & Richardsa, A. L. (2013). Molecular Typing of “*Candidatus Bartonella ancashi*,” a New Human Pathogen Causing Verruga Peruana. *Journal of Clinical Microbiology*, 51 (11): 3865–3868.
- Munsterman, L. (2005). Phlebotomine San flies, the Psychodidae. *Biology of disease vectors*. Elsevier.141-151.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2017 Apr 29]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Negrón, R., Guelfand, L & Perrone, M. C. (2008). *Manual de medios y reactivos del Laboratorio de Micología*. Buenos Aires: PAMR. Recuperado de: <http://www.uca.edu.ar/uca/common/grupo11/files/micologia-2013/Manual-de-Medios-y-Reactivos.pdf>. (2017-04-30).
- Norman, A., Regnery, R. Jameson. P., Greene, C., & Krause, D. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J Clin Microbiol*, 33: 1797–1803.
- Olalla, H. (2013). *Bartonelosis en el Área 3*. Dirección Hospital de Zumba, Zamora Chinchipe.
- Pritt, B. (2012). *Answer to case 204*. Inglaterra: London School. Recuperado de: <http://parasitewonders.blogspot.com/2012/04/answer-to-case-204.html>. (2017-04-30).
- Rubio, Y. P., Ramírez, R., Guzmán, H., & Estrada, Y. (2014). Evaluación de la trampa Mosquito Magnet® con y sin octenol para capturar mosquitos (Diptera: Culicidae). *Boletín de Malariología y Salud ambiental*, 54(1): 100-102.
- Sacks, D. & Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite – vector and vector – host interactions in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 453-483.
- Santamaría, E., Munstermann, L.E. & Ferro, C. (2002). Estimating carrying in a newly colonized sand fly *Lutzomyia serrana* (Diptera: Psychodidae). *J. Econ. Entomol.* 95 (1): 149-154.
- Saisongkorh, W., Barrassi, L., Davoust, B., De Broucker, C. A., Raoult, D., & Rolain, J. M. (2009). First isolation of *Bartonella bovis* from animals in French Guyana, South America. *Clinical Microbiology and Infection*, 15: 124–126.
- Snounou, G., Suganya, V., Xin Ping, Z., Jarra, M., Pinheiro, L., Do Rosario, V. E., Thaithong, S., & Brown, K. N. (1993). High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61:315-320.
- Sotomayor, H. (2016). Analogical mythical thought in the interpretation of pre-Hispanic art of interest to archaeological medicine and palaeopathology. *Repert Med Cir*, 25: 59-71.
- Tesh, R. & Guzman, H. (1996). *Sand flies and the agents they transmit*. The biology of disease vectors. University of Colorado Press: Niwot, Colorado.
- Thusberg, J. & Vihinen, M. (2009). Pathogenic or not? And if so, then how? Studying the effects of missense mutations using bioinformatics methods. *Hum Mutat*, 30: 703-714.

- Vela, G. (2014). *Variación genética de Nyssomyia trapidoi (Diptera: Psychodidae) en tres zonas endémicas de leishmaniasis cutánea en el Ecuador*. Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniería en Procesos biotecnológicos. Recuperado de: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3169/1/000110305.pdf>. (2017-05-04).
- Ventura, G. y Padilla, C. (2006). *Diagnóstico bacteriológico de la bartonelosis humana o enfermedad de Carrión*. Ministerio de Salud – Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.
- Verhulst, N. O., Takken, W., Dicke, M., Schraa, G., & Smallegange, R. C. (2010). Chemical ecology of interactions between human skin microbiota and mosquitoes. *FEMS Microbiol Ecol*, 74(1):1-9.
- Webb, C. (2004). *Evaluation of granular carbon dioxide sachets for use in combination with CDC and EVS light traps for collecting mosquitoes*. A report prepared for ICA. Department of Medical Entomology, University of Sydney & ICPMR, Westmead Hospital.
- Weinman, D. (1968). Bartonellosis. En D. Weinman (ed.) y M. Ristic (ed.), *Infectious blood diseases of man and animals*, vol2 (pp. 3-24). New York: Academic Press.
- 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). *Memoirs of the American Entomological Institute*, 54, Associated Publishers-American Entomological Institute, Gainesville, FL.
- Zapata, S. (2012). A study of a population of *Nyssomyia trapidoi* (Diptera:Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador. *Parasites and Vectors*, Volumen 144

12. TABLAS

Tabla No. 1: Localización de casos de 39 casos de bartonelosis registrados desde el año de 1995 hasta el 2005 en varias zonas ecuatorianas limítrofes con Perú.

LOCALIZACIÓN DE CADA CASO	FECHA	LOCALIZACIÓN DE CADA CASO	FECHA
1. Romerillos	Septiembre - 1995	21. Los Rubíes	Abril - 1997
2. Tolisos	Septiembre - 1995	22. LLanguachi	Mayo - 1997
3. Salapaca	Noviembre - 1995	23. Lagunas	Mayo - 1997
4. San Antonio	Diciembre - 1995	24. Lagunas	Junio - 1997
5. Salapaca	Diciembre - 1995	25. Palanuma	Junio - 1997
6. Salapaca	Enero - 1996	26. Romerillos	Diciembre - 1997
7. Palanuma	Enero - 1996	27. Punchis	Octubre - 1998
8. Chito	Enero - 1996	28. Huanchuna	Noviembre - 1998
9. Romerillos	Febrero - 1996	29. Los Rubíes	Enero - 1999
10. Bellavista	Marzo - 1996	30. Progreso	Mayo - 1999
11. Irachi	Marzo - 1996	31. Zumba	Marzo - 2000
12. Moyuche	Marzo - 1996	32. Bellavista	Junio - 2001
13. Irachi	Marzo - 1996	33. Isimanchi	Marzo - 2002
14. Progreso	Marzo - 1996	34. El Carmen	Mayo - 2002
15. Palanda	Mayo - 1996	35. Irachi	Octubre - 2002
16. Los Rubíes	Julio - 1996	36. Punchis	Abril - 2004
17. La Coordillera	Diciembre - 1996	37. La Coordillera	Mayo - 2005
18. Chito	Marzo - 1997	38. Huanchuna	Mayo - 2005
19. LLanguachis	Marzo - 1997	39. Los Guayus	Mayo - 2005
20. Zumba	Abril - 1997		

(Olalla, 2013).

Tabla No. 2: Organización de flebotomos en pools con códigos para Extracción de ADN. Se presenta la organización de cada individuo y especie para el proceso de extracción. Cada pool corresponde a una misma especie, colectada en el mismo sitio y fecha. Los códigos de pools corresponden a los códigos leídos durante la visualización de bandas en el gel de agarosa.

Especie identificada	No. Individuos	Código pool	Especie identificada	No. Individuos	Código pool
<i>Lu. robusta</i>	1	A1	<i>Lu. castanea</i>	1	A30
<i>Lu. robusta</i>	1	A2	<i>Lu. robusta</i>	1	A31
<i>Lu. robusta</i>	5	A3	<i>Lu. robusta</i>	1	A32
<i>Lu. robusta</i>	5	A4	<i>Lu. robusta</i>	1	A33
<i>Lu. robusta</i>	5	A5	<i>Lu. robusta</i>	1	A34

<i>Lu. robusta</i>	5	A6	<i>Lu. robusta</i>	1	A35
<i>Lu. maranonensis</i>	1	A7	<i>Lu. robusta</i>	1	A36
<i>Lu. robusta</i>	5	A8	<i>Lu. robusta</i>	1	A37
<i>Lu. robusta</i>	5	A9	<i>Lu. robusta</i>	1	A38
<i>Lu. robusta</i>	1	A10	<i>Lu. robusta</i>	1	A39
<i>Lu. robusta</i>	5	A11	<i>Lu. maranonensis</i>	1	A40
<i>Lu. robusta</i>	1	A12	<i>Lu. robusta</i>	1	A41
<i>Lu. robusta</i>	1	A13	<i>Lu. robusta</i>	1	A42
<i>Lu. robusta</i>	1	A14	<i>Lu. robusta</i>	1	A43
<i>Lu. robusta</i>	2	A15	<i>Lu. robusta</i>	1	A44
<i>Lu. robusta</i>	1	A16	<i>Lu. robusta</i>	1	A45
<i>Lu. robusta</i>	5	A17	<i>Lu. robusta</i>	1	A46
<i>Lu. robusta</i>	1	A18	<i>Lu. robusta</i>	1	A47
<i>Lu. robusta</i>	5	A19	<i>Lu. robusta</i>	1	A48
<i>Lu. robusta</i>	1	A20	<i>Lu. robusta</i>	1	A49
<i>Lu. robusta</i>	1	A21	<i>Lu. robusta</i>	1	A50
<i>Lu. maranonensis</i>	1	A22	<i>Lu. robusta</i>	1	A51
<i>Lu. robusta</i>	1	A23	<i>Lu. robusta</i>	1	A52
<i>Lu. robusta</i>	1	A24	<i>Lu. robusta</i>	1	A53
<i>Lu. robusta</i>	5	A25	<i>Lu. robusta</i>	1	A54
<i>Lu. robusta</i>	1	A26	<i>Lu. robusta</i>	1	A55
<i>Lu. robusta</i>	1	A27	<i>Lu. robusta</i>	1	A56
<i>Lu. robusta</i>	1	A28	<i>Lu. robusta</i>	1	A57
<i>Lu. robusta</i>	5	A29	<i>Lu. maranonensis</i>	1	A58

(LEMMT-USFQ).

Tabla No. 3: Método estandarizado en 4 pasos y con tiempo, para la clarificación y montaje de flebótomos.

No. de paso	Descripción	Tiempo
1	Inicialmente se saca el flebótomo de alcohol y se lo pasa hacia una gota solución salina puesta sobre una placa portaobjetos.	1 minuto
2	En la solución salina se corta la cabeza, últimos segmentos abdominales y ala.	2 minutos
3	El restante cuerpo se almacena en alcohol al 70%. La cabeza, últimos segmentos abdominales y ala; son transferidos hacia una gota de lactofenol (para clarificar) sobre una placa portaobjetos, y se cubre con una placa cubre objetos.	8 horas
4	Las partes clarificadas son transferidas hacia una gota de Goma Cloral (Hidrato de Cloral 30%, Goma Arábica	2 minutos

	20% y Glicerina 13%) dispuesta sobre una placa portaobjetos. Se acomodan las partes y se tapa con una placa cubre objetos.	
--	--	--

Fuente: (LEMMT-USFQ).

Tabla No. 4: Información detallada de las muestras analizadas taxonómicamente (localidad, parroquia, cantón, provincia, especies, fecha, tipo de trampa y sitio de colecta).

Ubicación	Parroquia	Cantón	Provincia	Especies	No. Hembras	Fecha	Tipo de trampa	Sitio de colecta
Isimanchi	Chito	Chinchiipe	Zamora Chinchiipe	<i>Lu. robusta</i>	1	17-Nov-16	CDC	Cafetal
Isimanchi	Chito	Chinchiipe	Zamora Chinchiipe	<i>Lu. maranonensis</i>	1	17-Nov-16	CDC	Cafetal
Isimanchi	Chito	Chinchiipe	Zamora Chinchiipe	<i>Lu. robusta</i>	1	17-Nov-16	CDC	Intradomicilio
Isimanchi	Chito	Chinchiipe	Zamora Chinchiipe	<i>Lu. maranonensis</i>	1	17-Nov-16	CDC	Intradomicilio
Maniales	Pucapamba	Chinchiipe	Zamora Chinchiipe	<i>Lu. robusta</i>	3	22-Dic-16	CDC	Intradomicilio
Maniales	Pucapamba	Chinchiipe	Zamora Chinchiipe	<i>Lu. robusta</i>	6	22-Dic-16	Mosquito Magnet	Peridomicilio
Río Mayo	Chito	Chinchiipe	Zamora Chinchiipe	<i>Lu. castanea</i>	1	22-Dic-16	Cebo humano protegido	Peridomicilio
Río Mayo	Chito	Chinchiipe	Zamora Chinchiipe	<i>Lu. robusta</i>	22	22-Dic-16	Cebo humano protegido	Peridomicilio
Río Mayo	Chito	Chinchiipe	Zamora Chinchiipe	<i>Lu. robusta</i>	63	23-Dic-16	Cebo humano protegido	Peridomicilio
Río Mayo	Chito	Chinchiipe	Zamora Chinchiipe	<i>Lu. maranonensis</i>	3	23-Dic-16	Cebo humano protegido	Peridomicilio
Maniales	Pucapamba	Chinchiipe	Zamora Chinchiipe	<i>Lu. robusta</i>	12	23-Dic-16	Mosquito Magnet	Peridomicilio

Fuente: (LEMMT-USFQ)

Tabla No. 5: Cuantificación de 59 pools de ADN extraído. Códigos por pool, fecha y hora de cuantificación, concentración (ng/μl), relación 260/280 y 260/230.

Código de pool	Fecha y hora	Concentración	Unidad	A260	A280	260/280	260/230
A1	08/12/2016 18:27:45	6,9	ng/μl	0,138	0,099	1,4	0,18
A2	08/12/2016 18:29:24	9,8	ng/μl	0,195	0,073	2,67	0,15
A3	08/12/2016 18:31:37	12,2	ng/μl	0,245	0,121	2,02	0,21
A4	08/12/2016 18:32:53	11,5	ng/μl	0,23	0,111	2,08	0,44
A5	08/12/2016 18:33:49	23,6	ng/μl	0,471	0,211	2,23	0,48
A6	09/12/2016 11:12:32	13,3	ng/μl	0,266	0,123	2,16	1,12
A7	09/12/2016 11:13:18	6,3	ng/μl	0,125	0,058	2,15	0,24
A8	09/12/2016 11:14:35	17,3	ng/μl	0,347	0,151	2,3	0,59
A9	09/12/2016 11:17:05	17,3	ng/μl	0,347	0,146	2,38	2,24
A10	09/12/2016 11:18:38	5,6	ng/μl	0,112	0,052	2,15	0,27
A11	09/12/2016 11:19:38	16,9	ng/μl	0,338	0,157	2,15	1,31
A12	07/03/2017 17:16:51	11,7	ng/μl	0,234	0,095	2,46	0,17
A13	07/03/2017 17:18:04	14,9	ng/μl	0,298	0,094	3,17	0,16
A14	07/03/2017 17:19:36	6,1	ng/μl	0,123	0,054	2,28	0,27
A15	07/03/2017 17:20:28	16,7	ng/μl	0,334	0,115	2,9	0,5
A16	07/03/2017 17:22:01	2,3	ng/μl	0,046	0,01	4,39	-0,12
A17	07/03/2017 17:22:50	20,8	ng/μl	0,416	0,173	2,4	0,6
A18	07/03/2017 17:23:40	7,1	ng/μl	0,141	0,089	1,59	0,65
A19	07/03/2017 17:24:25	17,3	ng/μl	0,346	0,146	2,37	2,45
A20	07/03/2017 17:25:10	4,7	ng/μl	0,093	0,027	3,5	-0,53
A21	07/03/2017 17:25:56	3,3	ng/μl	0,066	0,027	2,43	-0,25
A22	07/03/2017 17:32:22	20,7	ng/μl	0,413	0,114	3,63	0,14
A23	07/03/2017 17:33:22	15,5	ng/μl	0,31	0,054	5,7	0,14
A24	07/03/2017 17:34:04	8,7	ng/μl	0,174	0,042	4,18	0,16
A25	07/03/2017 17:34:44	14,9	ng/μl	0,298	0,116	2,56	1,29
A26	07/03/2017 17:35:23	14,5	ng/μl	0,29	0,136	2,13	0,38
A27	07/03/2017 17:36:27	8,7	ng/μl	0,174	0,08	2,18	0,54

A28	07/03/2017 17:37:12	5	ng/μl	0,099	0,026	3,8	3,81
A29	07/03/2017 17:37:51	22,3	ng/μl	0,446	0,156	2,86	0,34
A30	07/03/2017 17:38:40	18,6	ng/μl	0,371	0,174	2,13	0,24
A31	07/03/2017 17:39:30	1064,4	ng/μl	21,29	4,714	4,52	0,44
A32	07/03/2017 17:40:13	910,9	ng/μl	18,22	3,983	4,57	0,3
A33	07/03/2017 17:41:08	780,6	ng/μl	15,61	3,528	4,43	0,21
A34	07/03/2017 17:41:58	784,1	ng/μl	15,68	3,603	4,35	0,21
A35	07/03/2017 17:42:33	781,2	ng/μl	15,63	3,643	4,29	0,21
A36	07/03/2017 17:43:18	841,3	ng/μl	16,83	3,928	4,28	0,25
A37	07/03/2017 17:44:27	9,2	ng/μl	0,185	0,044	4,24	0,24
A38	07/03/2017 17:45:10	10	ng/μl	0,201	0,038	5,22	0,14
A39	07/03/2017 17:45:45	8,6	ng/μl	0,171	0,035	4,83	0,13
A40	07/03/2017 17:47:48	7,7	ng/μl	0,154	0,03	5,16	0,17
A41	07/03/2017 17:48:25	6,1	ng/μl	0,122	0,017	7,35	0,2
A42	07/03/2017 17:50:54	3,2	ng/μl	0,064	0,006	10,25	0,45
A43	07/03/2017 17:51:44	5,7	ng/μl	0,114	0,001	173,14	0,14
A44	07/03/2017 17:52:20	5,6	ng/μl	0,113	0,003	34,46	0,19
A45	07/03/2017 17:53:03	6,3	ng/μl	0,126	0,006	19,82	0,15
A46	07/03/2017 17:53:39	12,5	ng/μl	0,25	0,087	2,86	0,16
A49	07/03/2017 17:54:22	4,9	ng/μl	0,098	0,019	5,12	0,37
A51	07/03/2017 17:55:44	8,4	ng/μl	0,168	0,08	2,1	0,37
A55	07/03/2017 17:56:29	5,9	ng/μl	0,117	0,038	3,12	0,14
A56	07/03/2017 17:57:49	17,2	ng/μl	0,344	0,188	1,83	0,32
A57	07/03/2017 17:58:27	3,8	ng/μl	0,076	0,004	19,42	0,1
A58	07/03/2017 17:59:02	5,7	ng/μl	0,113	0,029	3,89	0,27

Fuente: (LEMMT-USFQ).

Tabla No. 6: Secuencias de ADN de cada muestra positiva, con la identidad del BLAST en el Gen Bank y la especie correspondiente.

Muestra	Secuencia	Ident	Especie
A11	GCGTGATTGTTCTCGTTATACAGAAAATAAACGTGCT GTAGAGGATAAATACATTGGTCCTCTTGTTAAAACGTGTT ATGACACGGTGTATTCACTGTACACGTTGTATCCGTTTT ACAACAGAAGTTGCAGGTATTTCAGAAGTTGGTTAAT TGGTCGTGGTGAAGACGCTGAAATTACGACATATCTTG AAAAAGCGATGACATCTGAATTACAGGGAAATGTTATT GATCTCTGTCCAGTTGGAGCTTTAACTTCAAACCTTAC GCGTTTCATGCACGGCCATGGGAATTGATTAACACAGA ATCGATTGATGTGATGGATGCTCTCGGTAGTGCTATTC GTATTGATAGCCGTGGTCGTG	99%	<i>Bartonella Bacilliformis</i>
A18	CGTGATTGTTCTCGTTATACAGAAAATAAACGTGCTGTA GAGGATAAATACATTTGGTCCTCTTGTTAAAACGTGTTAT GACACGGTGTATTCACTGTACACGTTGTATCCGTTTTAC AACAGAAGTTGCAGGTATTTCAGAAGTTGGTTAATTG GTCGTGGTGAAGACGCTGAAATTACTACATATCTTGAA AAAGCGATGACATCTGAATTACAGGGAAATGTTATTGA TCTCTGTCCAGTTGGAGCTTTAACTTCAAACCTTACGC GTTTCATGCACGGCCATGGGAATTGATTAACACAGAAT CGATTGATGTGATGGATGCTCTCGGTAGTGCTATTCGT ATTGATAGCCGTGGTCGTGA	99%	<i>Bartonella Bacilliformis</i>
A30	TGTCAGATTGTCCCGGAGAAGGTTTTTCCGTTTTATCCC GGGAGGGCTTGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCGCGCGCT TGATAAGCGTGAGGTTCGGAGGTTCAAGTCTCCAGGC CCACCATTTATTCCAGG	93%	<i>Bartonella Bacilliformis</i>
A39	CCCAAGCCTTTGGCGATCTGTTCTCAAGACGTTTGAG ATAGTTTAGAAGACCTTTATTTTTGGGTCTGTTTTAT TATTTGTCAGATCGTACCGGAGAAGGTTTTTCCGTTTA TCCCCGAGGGCTTGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCGCGC GCTTGATAAGCGTGAGGTTCGGAGGTTCAAGTCTCCCA GGCCACCATTTCTTTCAGGTTTATCTCAAGCTCACTTCA AGTTTACCTTGTCCATTCTGTAAAACTTTTACAGTTT TTTAAAGGGTATGCGCAATATGGACCCCGTCCAGTAAA AGCTGGTGTAAAGACCAATAAAGAATGTGAAGTGTA AGAGTGTTCAAGGGTGTATATAAAGTTTAGAGCTTAA GATTTGGATGGGAGCTTAGGATTTAGAATTGTGTTCTA AGTGTGTTGCTTGTATTAGATGTTATTCTATGAAAGGGG CCGTAGCTCAGCTGGGAGAGCACCTGCTTTCAGCAG G	91%	<i>Bartonella Bovis</i>
A44	TCTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTTTGGCGATCTGCGC	99%	<i>Bartonella</i>

	CTCATAAATGTTTGAATAAATATTTTAAGAGAGGCACTC ATAAATTTTGAGATAGTTGAGAAGACCTTTTGTTCGCTG GTCTGTTTATTGTGATGTCAGATTGTACCGGAGAAGG TTTTCCGGTTTATCCCGGAGGGCTTGTAGCTCAGTTGG TTAGAGCGCGCGCTTGATAAGCGTGAGGTCGGAGGTT CAAGTCCTCCCAGGCCACCATTATCCAGGCCTATGA TTGATTTCTAGGCAGACATTAATTCCAGGCTTATCTTAT AGTTTTAGGTTTACTATGTGTGGTTGCGTTTTTATCTTT AACTGCCATGTTGTTTCGGTTAAAGAGGGGCGTAGCTC AGCTGGGAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCGT CGTTCA		<i>bacilliformis</i>
--	---	--	----------------------

Fuente: (NCBI)

13. FIGURAS



Figura No. 1: Máscara de cerámicas de la Cultura ecuatoriana Jama-Coaque con Verruga Peruana. **Fuente:** (Sotomayor, 2016).

Máscara de cerámica perteneciente a la cultura ecuatoriana Jama-Coaque. La máscara representa erupciones de rostro similares a las presentadas en los casos clínicos de Verruga Peruana en la enfermedad de bartonelosis humana.

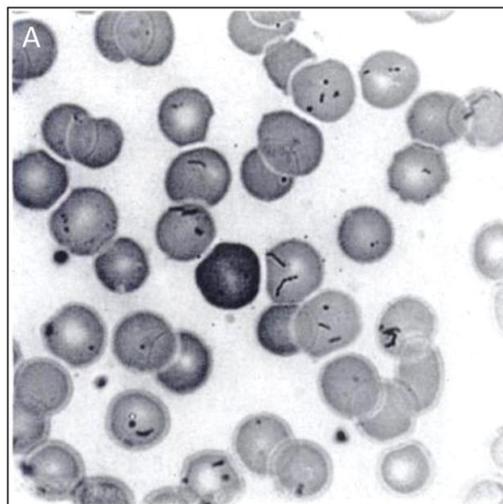


Figura No. 2: Infección eritrocitaria durante la Enfermedad de Carrión. **Fuente:** (Minnick, 2014).

Frotis de sangre con tinción Wright de una Infección eritrocitaria durante la Fiebre de Oroya o primera fase de bartonelosis humana.



Figura No. 3: Lesiones de Verruga Peruana durante la Enfermedad de Carrión.
Fuente: (Minnick, 2014).

Manifestación clínica de la Verruga Peruana o segunda fase de bartonelosis humana en un niño peruano.



Figura No. 4: Flebótomo - *Lutzomyia robusta*

Este flebótomo, manta blanca o titira de la especie *Lutzomyia robusta*. Foto tomada en el Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical USFQ (LEMMT-USFQ).

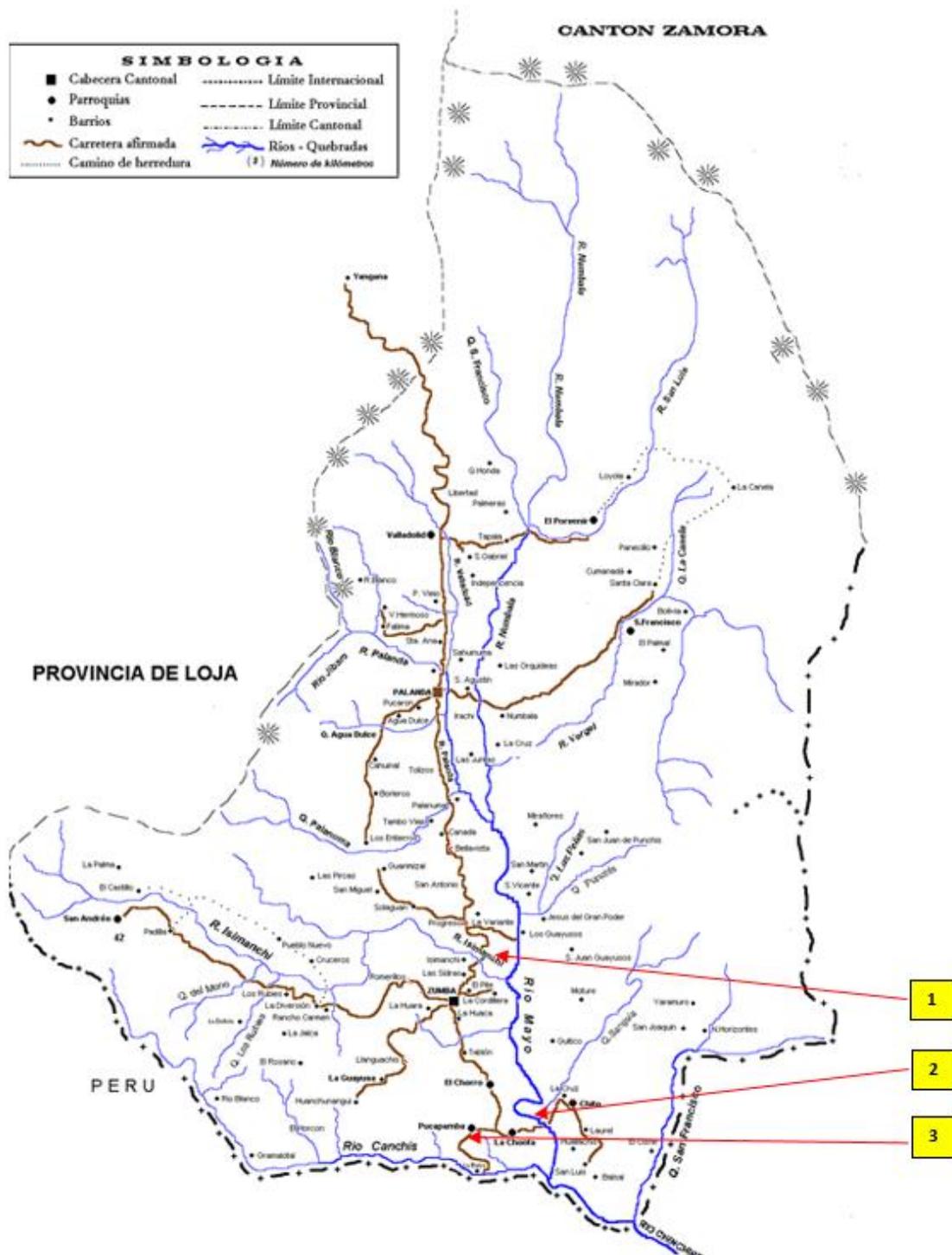


Figura No. 6: Área de estudio en donde se realizaron las colectas entomológicas
Fuente: (Olalla, 2013)

En amarillo, con el número 1 se ubica a la zona de Isimanchi, con 2 a la zona de Río Mayo y con el 3 a la zona de Maniales.

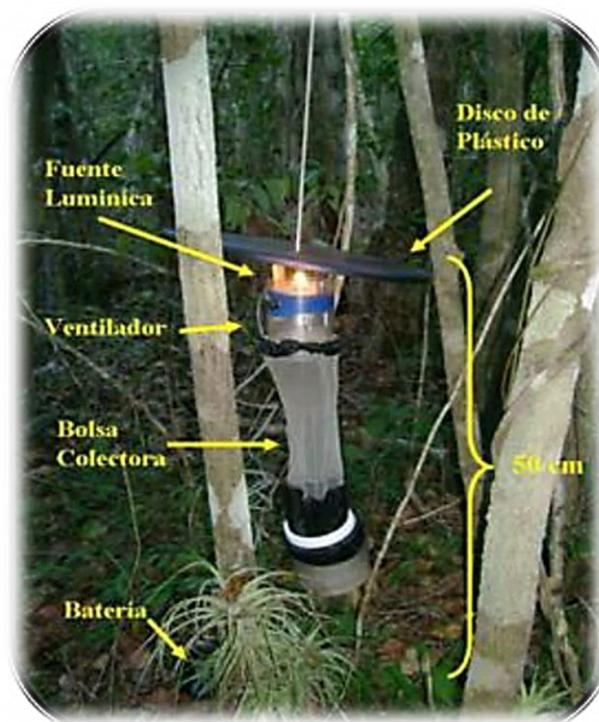


Figura No. 7: Trampa de luz CDC y sus componentes. **Fuente:** (Moo-Llanes & Rebollar, 2009).



Figura No. 8: Trampa Mosquito Magnet y sus componentes. **Fuente:** (Antero, 2012).



Figura No. 9: Equipo protector para colección con cebo humano. Foto tomada en el Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical USFQ (LEMMT-USFQ).

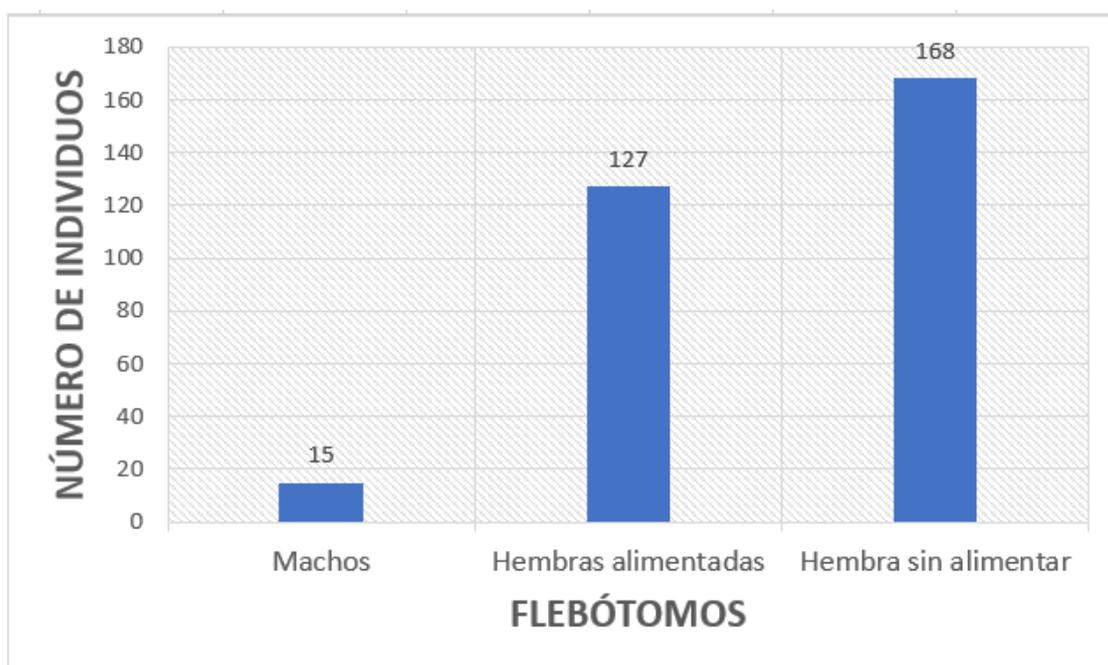


Figura No. 10: Número de flebotomos colectados y clasificados en machos, hembras alimentadas de sangre y hembras sin alimentarse. Fuente: Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical USFQ (LEMMT-USFQ).

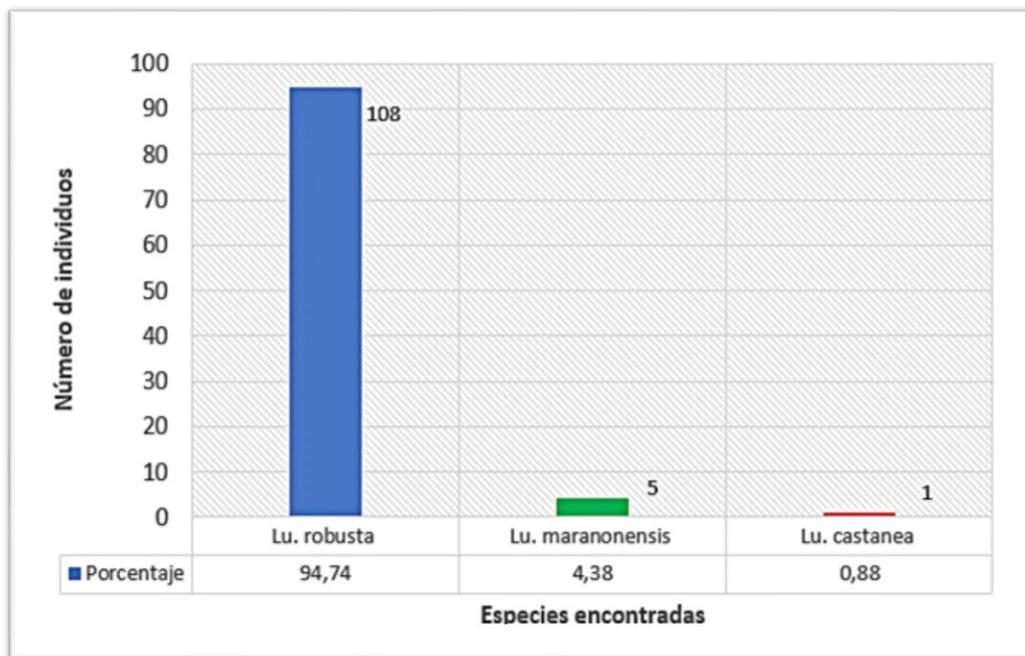


Figura No. 11: Número de individuos de las tres especies identificadas. Fuente: Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical USFQ (LEMMT-USFQ).

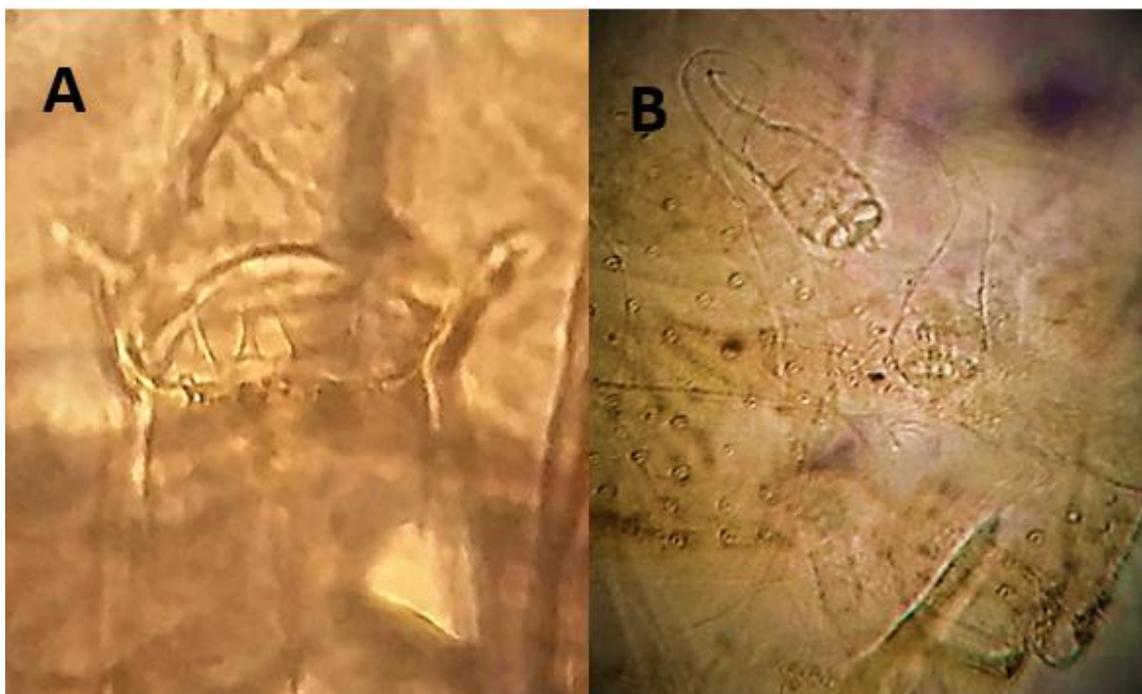


Figura No. 12: Dientes horizontales y verticales (A) y espermateca (B) de *Lutzomyia robusta*. Foto tomada en el Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical USFQ (LEMMT-USFQ).

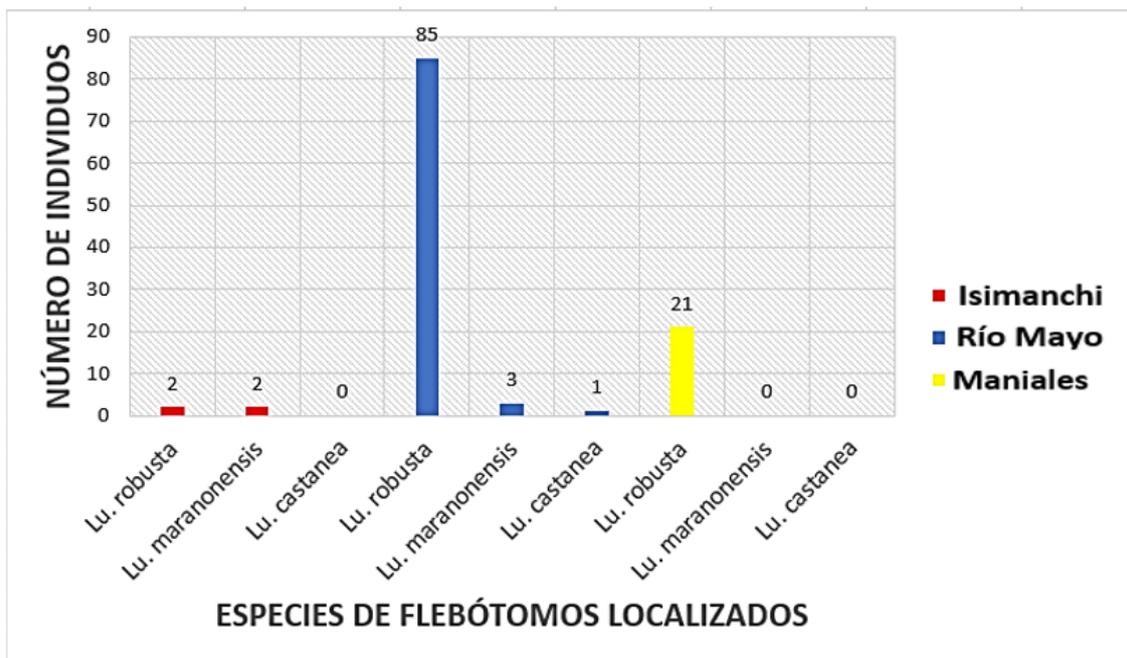


Figura No. 13: Número de individuos de cada especie de flebotomo localizada en las tres zonas de colecta. **Fuente:** Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical USFQ (LEMMT-USFQ).

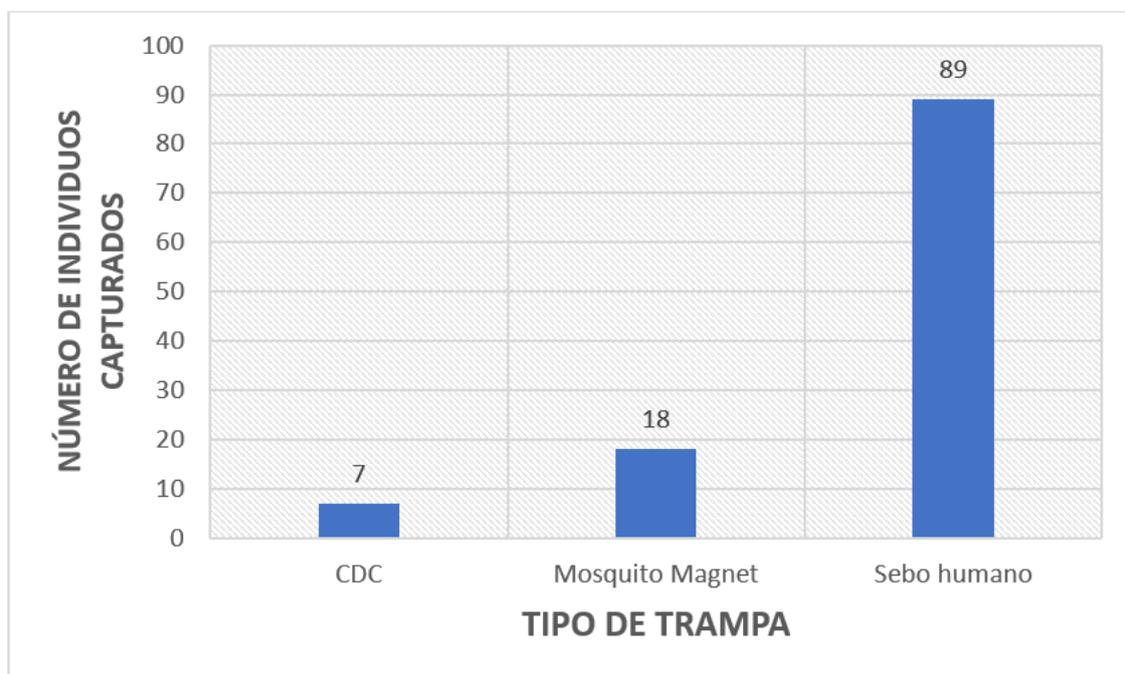


Figura No. 14: Número de individuos (hembras) de acuerdo al tipo de trampa. **Fuente:** Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical USFQ (LEMMT-USFQ).

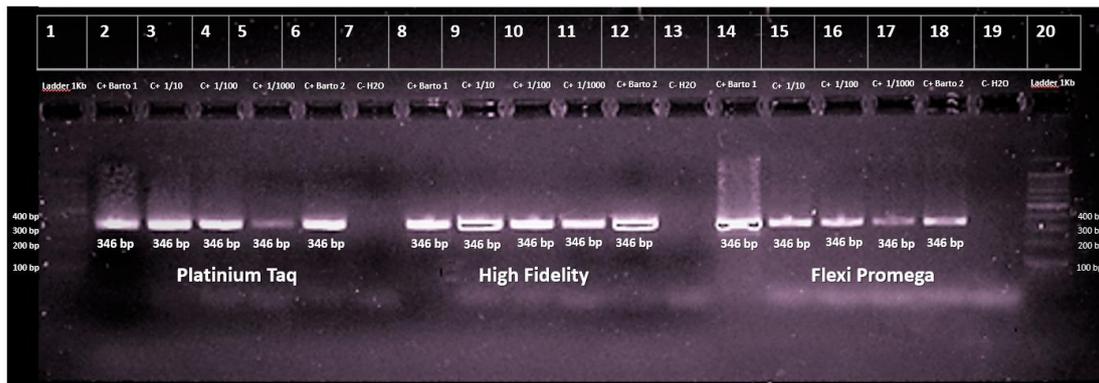


Figura No. 15: Estandarización del protocolo para la detección de *Bartonella* spp. mediante la amplificación de la región NADH deshidrogenasa subunidad gamma.

Se muestra la amplificación de controles positivos para *Bartonella* spp. con 3 enzimas diferentes. Los pocillos se han etiquetado del 1 al 20. En el 1, se amplifica el Ladder de 1Kb Plus marca Invitrogen. En el 2, 8 y 14; se amplifica el control positivo Barto1. En el 3, 9 y 15; se amplifica el control positivo Sandy 8 diluido 1/10. En el 4, 10 y 16; se amplifica el control positivo Sandy 8 diluido 1/100. En el 5, 11 y 17; se amplifica el control positivo Sandy 8 diluido 1/1000. En el 6, 12 y 18; se amplifica el control positivo Barto2. En el 7, 13 y 19; se amplifica H₂O como control negativo. Finalmente, en el pocillo 20, se amplifica otro Ladder de 1Kb Plus marca Invitrogen.

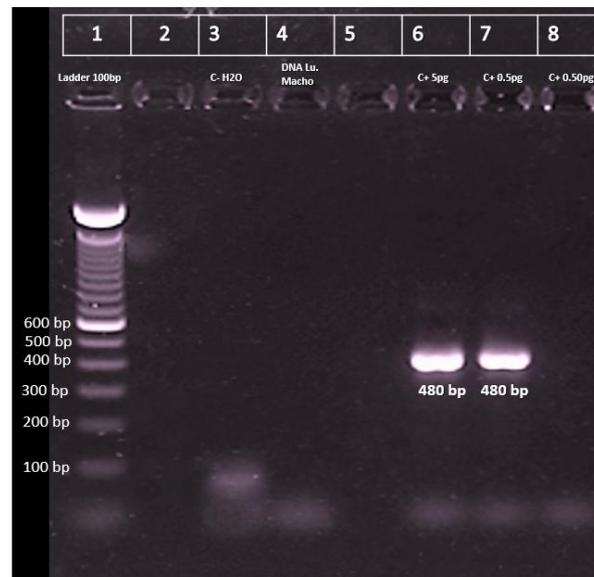


Figura No. 16: Estandarización del protocolo para la detección de *Bartonella* spp. mediante la amplificación de la región ITS.

Se muestra la amplificación de controles positivos para *Bartonella* spp. con la enzima Flexi Promega. Los pocillos se han etiquetado del 1 al 8. En el 1, se amplifica el Ladder de 100 pb marca Invitrogen. El pocillo 2 está vacío. El pocillo 3 amplifica H₂O como control negativo. El pocillo 4 amplifica ADN de *Lutzomyia* spp. como control negativo. El 5 está vacío. El 6 amplifica el control positivo diluido en 5pg. El 7 amplifica el control positivo diluido en 0.5pg y el 8 amplifica el control positivo diluido en 0.05pg.



Figura No. 17: Estandarización del protocolo para la detección de *Bartonella* spp. mediante la amplificación del ADN del gen de la enzima Citrato Sintasa.

Se muestra la amplificación de controles positivos para *Bartonella* spp. con la enzima Flexi Promega. Los pocillos se han etiquetado del 1 al 10. En el 1, se amplifica el Ladder de 100 pb marca Invitrogen. El pocillo 2 está vacío. El pocillo 3 amplifica el control positivo diluido en 0.05ng. El pocillo 4 no amplificó el control positivo diluido en 0.005ng. El pocillo 5 amplifica el control positivo diluido en 0.5ng. El pocillo 6 amplifica el control positivo diluido en 0.05ng. El pocillo 7 amplifica el control positivo diluido en 0.005ng. El pocillo 8 no amplificó el control diluido en 0.5pg. El pocillo 9 amplificó el control Barto2. En el pocillo 10 cargó el H₂O como control negativo.

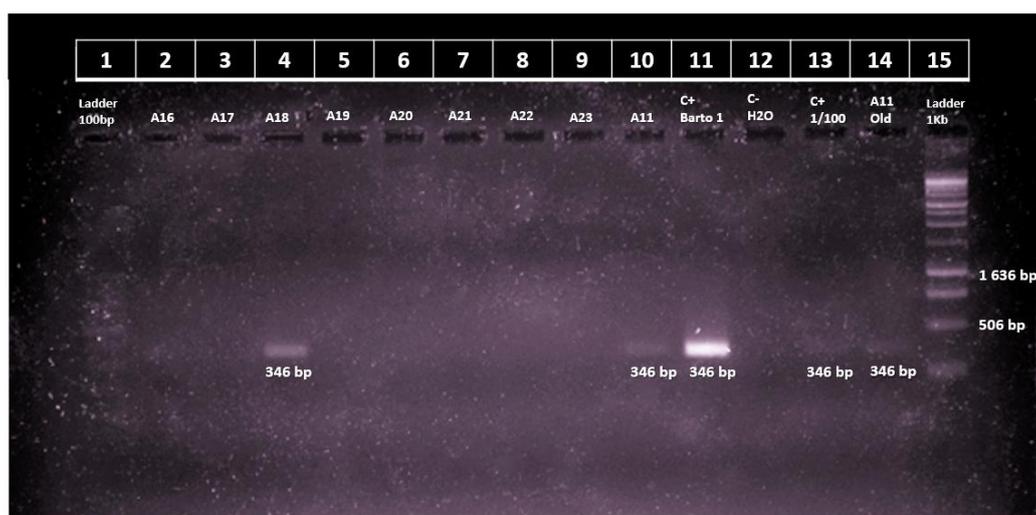


Figura No. 18: Detección molecular de *Bartonella* spp. mediante la amplificación de la región NADH deshidrogenasa subunidad gamma.

Se muestra la amplificación de controles y muestras positivas para *Bartonella* spp. con la enzima Platinum Taq. Los pocillos se han etiquetado del 1 al 15. En el 1, se amplifica de manera tenue el Ladder de 100 pb marca Invitrogen. Para el pocillo 2, 3, 5, 6, 7, 8 y 9; las muestras de pools analizadas son negativas. El pocillo 4 y el 10, presentan bandas positivas para las muestras codificadas como A18 y A11, respectivamente. Ambas muestras representan a pools de 5 individuos de *Lu. robusta*, amplificando con 440 pares de bases al igual que el control positivo. El pocillo 11 presenta la banda del control positivo Barto.1 de *Bartonella* spp. En el pocillo 12 se cargó el control negativo que es agua. En el pocillo 13, se amplificó de forma tenue la banda del control Sandy 8 diluido 1/100. El pocillo 14, presenta la banda de la amplificación de la muestra A11 que se había obtenido en de un PCR anterior. En el pocillo 15, se amplifica el Ladder de 1Kb marca Invitrogen.



Figura No. 19: Detección molecular de *Bartonella* spp. mediante la amplificación de la región ITS.

Se muestra la amplificación de controles y muestras positivas para *Bartonella* spp. con la enzima Flexi Taq. Los pocillos se han etiquetado del 1 al 19. En el 1, se amplifica el Ladder de 100 pb marca Invitrogen. Para el pocillo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16 y 17; las muestras de pools analizadas son negativas. El pocillo 12, presenta una banda positiva para la muestra codificada como A30. Esta muestra representa al pool de un individuo de *Lu. castanea*, amplificando con 490 pares de bases al igual que el control positivo. El pocillo 18 presenta una banda tenue del control positivo diluido a 0.5 pg de *Bartonella* spp. En el pocillo 19 se cargó el control negativo que es agua.



Figura No. 20: Detección molecular de *Bartonella* spp. mediante la amplificación de la región ITS.

Se muestra la amplificación de controles y muestras positivas para *Bartonella* spp. con la enzima Flexi Taq. Los pocillos se han etiquetado del 1 al 17. En el 1, se amplifica el Ladder de 100 pb marca Invitrogen. Para el pocillo 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14 y 15; las muestras de pools analizadas son negativas. Los pocillos 5 y 10, presentan bandas positivas para las muestras codificadas como A39 y A44, respectivamente. Estas muestras representan a los pools de un individuo de *Lu. robusta*, amplificando con 490 pares de bases al igual que el control positivo. El pocillo 16 presenta una banda tenue del control positivo diluido a 0.5 pg de *Bartonella* spp. En el pocillo 17 se cargó el control negativo que es agua.

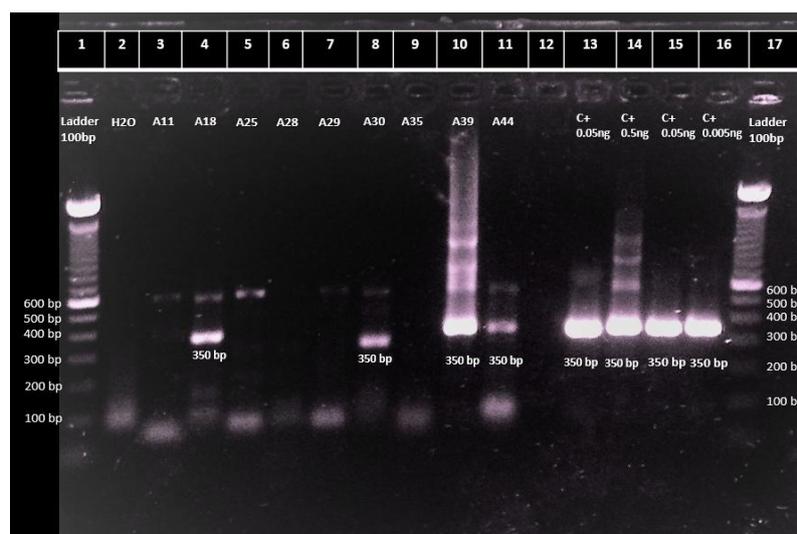


Figura No. 21: Detección molecular de *Bartonella* spp. mediante la amplificación del ADN del gen de la enzima Citrato Sintasa.

Se muestra la amplificación de controles y muestras positivas para *Bartonella* spp. con la enzima Flexi Taq. Los pocillos se han etiquetado del 1 al 17. En el 1, se amplifica el Ladder de 100 pb marca Invitrogen. En el pocillo se tiene al H₂O como control negativo. Para el pocillo 3, 5, 6, 7 y 9; las muestras de pools analizadas son negativas. Los pocillos 4, 8, 10 y 11; presentan bandas positivas para las muestras codificadas como A18, A30, A39 y A44, respectivamente. La muestra A18 representa a un pool de 5 individuos de *Lu. robusta*, la A30 un pool de un individuo de *Lu. castanea*, la A39 y A44 a pools de un individuo de *Lu. robusta*. La amplificación de cada muestra positiva se dio en 350 pares de bases al igual que el control positivo. El pocillo 16 presenta una banda tenue del control positivo diluido a 0.5 pg de *Bartonella* spp. En los pocillos 13 y 15, se amplifica un control diluido en 0.05ng, en el pocillo 14 un control de diluido en 0.5ng y en el pocillo 16 un control diluido a 0.005ng. En el pocillo 17, se amplifica el Ladder de 100 pb marca Invitrogen.

```

Query 2      GCGGTGATTGTTCTCGTTATACAGAAAATAAACGTGCTGTAGAGGATAAAATACATTGGTC 61
Sbjct 836856 GCGGTGATTGTTCTCGTTATACAGAAAATAAACGTGCTGTAGAGGATAAAATACATTGGTC 836915
Query 62     CTCTTGTTAAACTGTTATGACACGGTGTATTCACTGTACACGTTGTATCCGTTTTACAA 121
Sbjct 836916 CTCTTGTTAAACTGTTATGACACGGTGTATTCACTGTACACGTTGTATCCGTTTTACAA 836975
Query 122    CAGAAGTTCAGGTAATTCAGAACTTGGTTTAAATTGGTCGTGGTGAAGACGCTGAAATTA 181
Sbjct 836976 CAGAAGTTCAGGTAATTCAGAACTTGGTTTAAATTGGTCGTGGTGAAGACGCTGAAATTA 837035
Query 182    CTACATATCTTGAAAAAGCGATGACATCTGAATTACAGGGAAAIGTTATTGATCTCTGTC 241
Sbjct 837036 CTACATATCTTGAAAAAGCGATGACATCTGAATTACAGGGAAAIGTTATTGATCTCTGTC 837095
Query 242    CAGTTGGAGCTTTAACTTCAAAACCTTACGCGTTTTCATGCACGGCCATGGGAATTGATT 301
Sbjct 837096 CAGTTGGAGCTTTAACTTCAAAACCTTACGCGTTTTCATGCACGGCCATGGGAATTGATT 837155
Query 302    AAACAGAAATCGATTGATGTGATGGATGCTCTCGGTAGTGTCTATTCTGATTTGATAGCCGTG 361
Sbjct 837156 AAACAGAAATCGATTGATGTGATGGATGCTCTCGGTAGTGTCTATTCTGATTTGATAGCCGTG 837215
Query 362    GTCGTG 367
Sbjct 837216 GTCGTG 837221

```

Figura No. 22: Comparación de la secuencia de la muestra A11 con el genoma completo de *Bartonella bacilliformis*.

La secuencia de la muestra A11 se denomina Query y la secuencia disponible en el NCBI, Sbjct. Al comparar las dos secuencias, se puede ver la mutación señalada en el interior del círculo rojo.

```

Query 1      GCGGTGATTGTTCTCGTTATACAGAAAATAAACGTGCTGTAGAGGATAAAATACATTGGTC 60
Sbjct 836856 GCGGTGATTGTTCTCGTTATACAGAAAATAAACGTGCTGTAGAGGATAAAATACATTGGTC 836915
Query 61     CTCATTGTTAAACTGTTATGACACGGTGTATTCACTGTACACGTTGTATCCGTTTTACAA 120
Sbjct 836916 CTC-ITGTTAAACTGTTATGACACGGTGTATTCACTGTACACGTTGTATCCGTTTTACAA 836974
Query 121    ACAGAAGTTCAGGTAATTCAGAACTTGGTTTAAATTGGTCGTGGTGAAGACGCTGAAATT 180
Sbjct 836975 ACAGAAGTTCAGGTAATTCAGAACTTGGTTTAAATTGGTCGTGGTGAAGACGCTGAAATT 837034
Query 181    ACTACATATCTTGAAAAAGCGATGACATCTGAATTACAGGGAAAIGTTATTGATCTCTGTC 240
Sbjct 837035 ACTACATATCTTGAAAAAGCGATGACATCTGAATTACAGGGAAAIGTTATTGATCTCTGTC 837094
Query 241    CCAGTTGGAGCTTTAACTTCAAAACCTTACGCGTTTTCATGCACGGCCATGGGAATTGATT 300
Sbjct 837095 CCAGTTGGAGCTTTAACTTCAAAACCTTACGCGTTTTCATGCACGGCCATGGGAATTGATT 837154
Query 301    AAACAGAAATCGATTGATGTGATGGATGCTCTCGGTAGTGTCTATTCTGATTTGATAGCCGTG 360
Sbjct 837155 AAACAGAAATCGATTGATGTGATGGATGCTCTCGGTAGTGTCTATTCTGATTTGATAGCCGTG 837214
Query 361    GGTCGTG 367
Sbjct 837215 GGTCGTG 837221

```

Figura No. 23: Comparación de la secuencia de la muestra A18 con el genoma completo de *Bartonella bacilliformis*.

