

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Ambientales y Biológicas

**Fauna de flebótomos (Diptera: Psychodidae) de los alrededores de
Bucay, Ecuador. Detección molecular de su infección natural por
Leishmania y *Bartonella***

Andrea Catalina Barreno Jácome

Biología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Bióloga

Quito, 9 de mayo de 2025

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Fauna de flebótomos (Diptera: Psychodidae) de los alrededores de Bucay,
Ecuador. Detección molecular de su infección natural por *Leishmania* y
*Bartonella***

Andrea Catalina Barreno Jácome

Nombre del profesor, Título académico

Renato León, Ph.D.

Nombre del profesor , Título académico

Patricio Rojas Silva , M.D., Ph.D.

Quito, 9 de mayo de 2025

© 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 la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Andrea Catalina Barreno Jácome

Código: 00331925

Cédula de identidad: 0503804551

Lugar y fecha: Quito, 9 de mayo de 2025

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

RESUMEN

La reemergencia de enfermedades transmitidas por vectores en América Latina resalta la necesidad urgente de fortalecer la vigilancia entomológica activa, especialmente en zonas ecológicas subrepresentadas. En este estudio se investigó la fauna de flebótomos y su infección natural con *Leishmania* spp. y *Bartonella* spp. en los alrededores de Bucay, situado al sur del Ecuador. Se recolectaron 347 flebótomos mediante métodos estandarizados, y se identificaron once especies, con predominancia de *Psychodopygus carrerai* y *Psathyromyia aclydifera*. Mediante PCR convencional no se detectó ADN de *Leishmania* spp., pero tres hembras resultaron positivas para *Bartonella* spp., hallazgo confirmado parcialmente por Nested PCR. Su secuenciamiento que está en proceso permitirá identificar a nivel de especie el patógeno. Estos flebótomos no han sido tradicionalmente vinculados a la transmisión de bartonellosis, lo que plantea nuevas preguntas sobre su papel epidemiológico en el país. Estos resultados alertan sobre la posible circulación silvestre de *Bartonella* spp. en flebótomos y subrayan la urgencia de ampliar el monitoreo entomológico a especies no incriminadas previamente como vectores. Este trabajo refuerza la necesidad de integrar herramientas taxonómicas y moleculares para anticipar y mitigar riesgos en salud pública.

Palabras clave: Flebótomos, *Leishmania*, *Bartonella*, transmisión vectorial, PCR, vigilancia entomológica, zoonosis, salud pública, Bucay.

ABSTRACT

The reemergence of vector-borne diseases in Latin America highlights the urgent need to strengthen entomological surveillance, particularly in ecologically underrepresented regions. This study examined the phlebotomine sand fly fauna and its natural infection with *Leishmania* spp. and *Bartonella* spp. in Bucay located in Southern Ecuador. A total of 347 specimens were collected and morphologically identified, revealing the presence of eleven species with *Psychodopygus carrerai* and *Psathyromyia aclydifera* being the most abundant. While *Leishmania* spp. DNA was not detected via conventional PCR, three female samples tested positive for *Bartonella* spp., with partial confirmation by Nested PCR. Its sequencing, which is currently in progress, will allow for pathogen species-level identification. Notably, these sand fly species have not been traditionally implicated in *Bartonella* transmission, raising new questions about their epidemiological role in the country. These findings alert on the potential sylvatic circulation of *Bartonella* and highlight the urgent need to expand entomological surveillance to previously unincriminated species as vectors of disease. This work underscores the importance of integrating morphological and molecular tools to anticipate and mitigate emerging public health threats.

Key words: Sand flies, *Leishmania*, *Bartonella*, vector transmission, PCR, entomological surveillance, zoonosis, public health, Bucay.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción.....	10
Contexto en Latinoamérica	10
Relevancia de la identificación de flebótomos y su incriminación de vectores en la epidemiología de la leishmaniasis y bartonelosis.....	11
Flebótomos	12
Caracteres taxonómicos.....	13
Clasificación Young – Duncan.....	15
Clasificación de flebótomos según Galati.	16
Leishmaniasis	18
Agente causal.....	18
Manifestaciones clínicas.....	18
Ciclo de transmisión.....	19
Bartonelosis humana	20
Agente causal.....	20
Manifestaciones clínicas.....	21
Otras Bartonelas.....	21
Situación en Ecuador	22
Objetivo general	24
Objetivos específicos	24
Metodología.....	25
Área de estudio.....	25
Colecta de especímenes	26
Montaje y clasificación de los especímenes.....	26
Extracción de ADN y reacción de cadena polimerasa (PCR)	27
Amplificación por PCR de <i>Leishmania</i> spp y <i>Bartonella</i> spp.....	27
Visualización de productos de PCR convencional para <i>Leishmania</i> spp. y <i>Bartonella</i> spp....	28
PCR anidada para <i>Bartonella</i> spp.	29
Cuantificación del ADN	30
Análisis de datos	30
Resultados.....	32
Fauna y abundancia de flebótomos.....	32
Indices ecológicos.....	33
Extracción y cuantificación de ADN.....	34
Reacción de cadena polimerasa y Nested PCR.....	35
Discusión	41
Conclusiones	44
Referencias bibliográficas	46
ANEXO A: Ubicación geográfica de los sitios de muestreo.....	55

Elimina

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización ecológica de los sitios de muestreo	<u>25</u>
Tabla 2. Abundancia de flebotomos por especie y provincia.....	<u>32</u>
Tabla 3. Cuantificación de ADN en muestras de Chimborazo y Cañar.	<u>34</u>

Eliminar

Eliminar

Eliminar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología detallada de estructuras anatómicas en flebótomos según (Young & Duncan, 1994).....	<u>14</u>
Figura 2. Morfología detallada de estructuras anatómicas de flebótomos machos según (Young & Duncan, 1994).	<u>15</u>
Figura 3. Abundancia de flebótomos por especie y provincia	<u>33</u>
Figura 4. Índice ecológicos por provincia	<u>34</u>
Figura 5. Amplificación del gen LCM para la detección de Leishmania spp.	<u>36</u>
Figura 6. Amplificación del gen ITS para la detección de Bartonella spp.....	<u>37</u>
Figura 7. Amplificación del gen LMC e ITS para la detección de Leishmania spp y Bartonella spp.	<u>38</u>
Figura 8. Amplificación de verificación de Bartonella spp.....	<u>39</u>
Figura 9. Amplificación mediante PCR anidada de las muestras de Bartonella spp	<u>40</u>
Figura 10. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo	<u>55</u>

Eliminar

Eliminar

Eliminar

Eliminar

Eliminar

Eliminar

Eliminar

Eliminar

Eliminar

Eliminar

INTRODUCCIÓN

Contexto en Latinoamérica

Las enfermedades tropicales desatendidas (ETD), término presentado desde el 2005 y acogido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), son un grupo de afecciones infecciosas diversas, prevalentes principalmente en zonas tropicales y subtropicales, donde proliferan entre las personas que viven en comunidades empobrecidas. Actualmente, las ETD representan un desafío para la salud pública en América Latina debido a su persistencia en diversas regiones y su difícil control. Estas patologías clasificadas como enfermedades infecciosas, poseen un origen parasitario, bacteriano, viral o fúngico. Dentro de éstas, las enfermedades de transmisión vectorial (leishmaniasis, malaria, enfermedad de Chagas y otras) dependen en gran medida de la presencia de especies vectores, de su ecología y su dinámica de transmisión (Altagracia-Martínez et al., 2012; Ready, 2013). Una de estas enfermedades, la leishmaniasis, por ejemplo, es transmitida por pequeños insectos voladores llamados flebótomos (Diptera: Psychodidae), ha sido reportada de todas las provincias del Ecuador incluyendo Galápagos (solo casos importados) (Anaconda et al., 2019) y es significativamente subnotificada. Este proyecto de titulación se enfoca en determinar la fauna de flebótomos en los alrededores de la población de Bucay, en los bordes de las provincias del Guayas, Chimborazo y Cañar. Para esta investigación se seleccionaron sitios de estudio pertenecientes al lado de Chimborazo y Cañar distantes unos 5 kilómetros uno del otro, ambas partes de la misma zona de bosque aledaños a las poblaciones de Bucay, Cumandá y Barranco Chico. En esta zona, la leishmaniasis es endémica y ha sido pobremente estudiada al igual que sus vectores. Además, se procedió a examinar molecularmente (mediante la reacción de cadena de la polimerasa) su infección natural por parásitos del género *Leishmania* y *Bartonella*.

Relevancia de la identificación de flebótomos y su incriminación de vectores en la epidemiología de la leishmaniasis y bartonelosis.

La leishmaniasis es una enfermedad prevalente y de amplia distribución en zonas tropicales y subtropicales y presenta ciclos complejos que no solo incluyen a los patógenos sino a reservorios en la naturaleza y a los vectores. Al contrario, la bartonelosis humana es una enfermedad poco conocida y restringida a los países Andinos como Perú , Ecuador y Colombia. Ambas enfermedades son transmitida solamente por las hembras infectadas de los flebótomos que, a diferencia de los machos, se alimentan de sangre (hematofagia) que les provee de nutrientes y energía para el desarrollo de los huevos. Es de gran importancia conocer con precisión qué especies de flebótomos actúan como vectores para entender la ecoepidemiología y dinámica de transmisión de estas enfermedades. De igual manera, el estudio de su comportamiento y distribución en los diferentes hábitats, permite desarrollar y aplicar las estrategias más adecuadas de control vectorial y prevención de la transmisión tanto de leishmaniasis como bartonelosis de esta enfermedad (Zorrilla et al., 2017).

La identificación taxonómica en base a la morfología es la primera línea de acción para identificar las especies de flebótomos. Sin embargo, hay especies que aunque morfológicamente muy similares, son diferentes y solamente pueden ser distinguidas usando biología molecular (especies crípticas). Estas especies crípticas pueden tener distintas capacidades para transmitir patógenos y responder distintamente a las medidas de control. Si bien los métodos tradicionales basados en el estudio de estructuras anatómicas específicas han sido útiles para clasificar a las diferentes especies de flebótomos, las nuevas técnicas moleculares están transformando nuestra comprensión de las relaciones evolutivas y filogenéticas entre estas especies (Rodrigues, 2023).

Para establecer el rol de una especie de insecto como vector, se requiere de un proceso meticuloso que no es fácil de investigar. Incluye pasos como encontrar la infección del patógeno en vectores silvestres, que la distribución de la enfermedad coincida con la distribución del vector, demostrar experimentalmente su capacidad de transmisión entre otros requisitos. Este monitoreo debe ser continuo, ya que tanto el clima cambiante como las alteraciones en los ecosistemas pueden modificar dónde y cómo viven estos insectos (Ready, 2013).

Flebótomos

Los flebótomos (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) son pequeños insectos voladores pertenecientes al suborden Nematóceras y su importancia médica radica en ser vectores de importantes enfermedades desatendidas de relevancia epidemiológica. De los cientos de especies descritas, solamente unas pocas han sido incriminadas en la transmisión de leishmaniasis, enfermedad distribuida en zonas tropicales y subtropicales en el Viejo y Nuevo Mundo, y de la bartonelosis humana, una enfermedad endémica solamente en países Andinos, y causada por la bacteria *Bartonella bacilliformis*. Además, algunos flebótomos han sido identificados como posibles vectores de arbovirus (virus transmitidos por vectores artrópodos: insectos y garrapatas).

Morfológicamente, los flebótomos son dípteros que miden entre 2-5 mm de longitud, caracterizados por presentar un tegumento densamente piloso, extremidades locomotoras elongadas y alas lanceoladas que mantienen en posición erecta durante el reposo. Su distribución abarca regiones tropicales y subtropicales de América, África, Asia y la cuenca mediterránea, con mayor diversidad específica en zonas con condiciones climáticas cálido-húmedas (Bravo-Barriga et al., 2022).

Las hembras exhiben hematofagia obligada necesaria para la maduración ovárica y el desarrollo gonotrófico (desarrollo de los huevos), mientras que los machos se alimentan exclusivamente de carbohidratos vegetales. La mayoría de las especies presentan hábitos silvestres y comportamiento zoofílico, aunque algunas han desarrollado adaptaciones sinantrópicas en respuesta a la modificación antropogénica del hábitat, colonizando ambientes peridomésticos y exhibiendo comportamiento antropofílico o preferencia por hospederos domésticos (Galati et al., 2017).

Caracteres taxonómicos.

Respecto a la identificación taxonómica de las hembras de flebótomos, esta se fundamenta en la distinción morfológica de las espermatecas: la forma y tamaño de la cabeza de la espermateca, tamaño y número de anillos si presentes y tamaño de los conductos individuales. Su configuración morfológica constituye un carácter diagnóstico para la determinación específica de las especies, sin embargo, en el caso de presencia de especies crípticas, donde la morfología de las espermatecas resulta insuficiente para la diferenciación taxonómica, se recurre a análisis morfométricos complementarios o técnicas moleculares para la correcta identificación (Goenaga-Mafud et al., 2020).

Otros caracteres diagnósticos relevantes incluyen el cibario, que presenta dientes horizontales y verticales; la faringe y la furca genital, cuyas variaciones morfométricas son específicas para cada especie. En los machos, la genitalia externa representa el principal carácter diagnóstico, compuesta por estructuras pareadas segmentadas que incluyen el estilo terminal, también llamado gonoestilo, coxite también llamado gonocoxite, parámero y el lóbulo lateral. El aedeagus, órgano copulador masculino, junto con la bomba y filamentos genitales, también exhiben características morfológicas de valor taxonómico (Galati & Ovallos, 2012). Como se puede ver en la Figura 1, las estructuras mencionadas corresponden

a los flebótomos hembras, mientras que en la Figura 2 se ilustran los caracteres de diagnósticos de los machos.

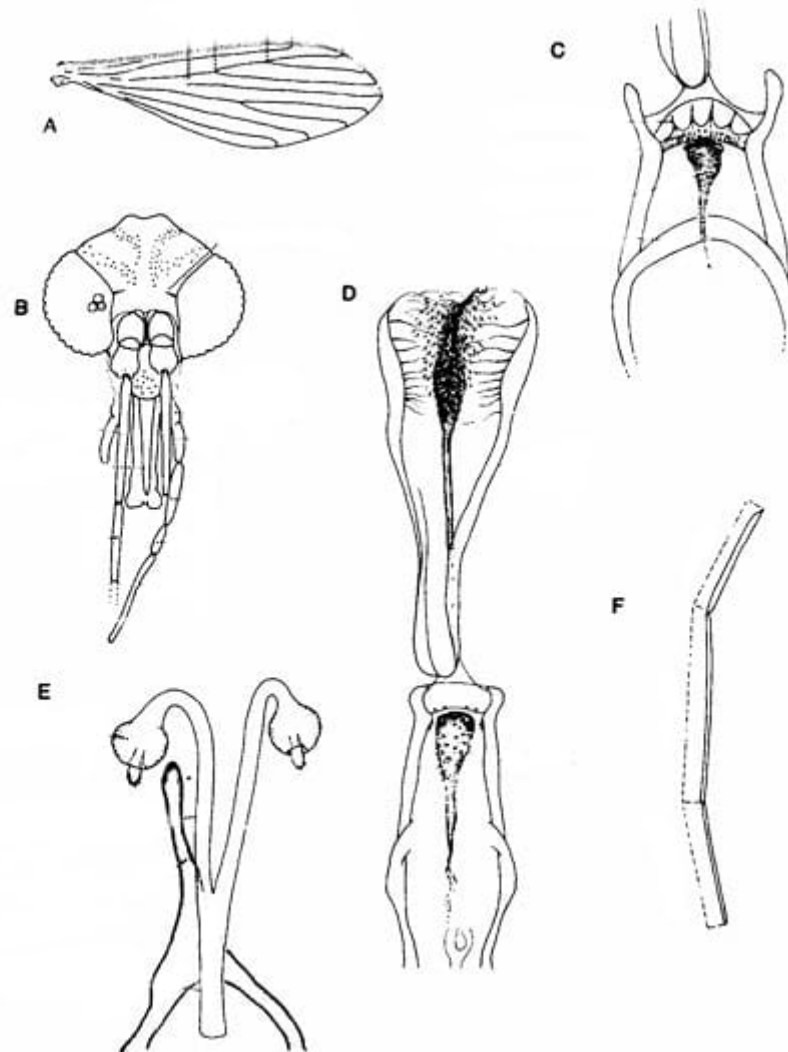


Figura 1. Morfología detallada de estructuras anatómicas en flebótomos (Young & Duncan, 1994). Se puede observar : A) ala , B) cabeza , C) cibario de la hembra , D) cibario y faringe de la hembra , E) espermateca y F) Patas posteriores (en parte).

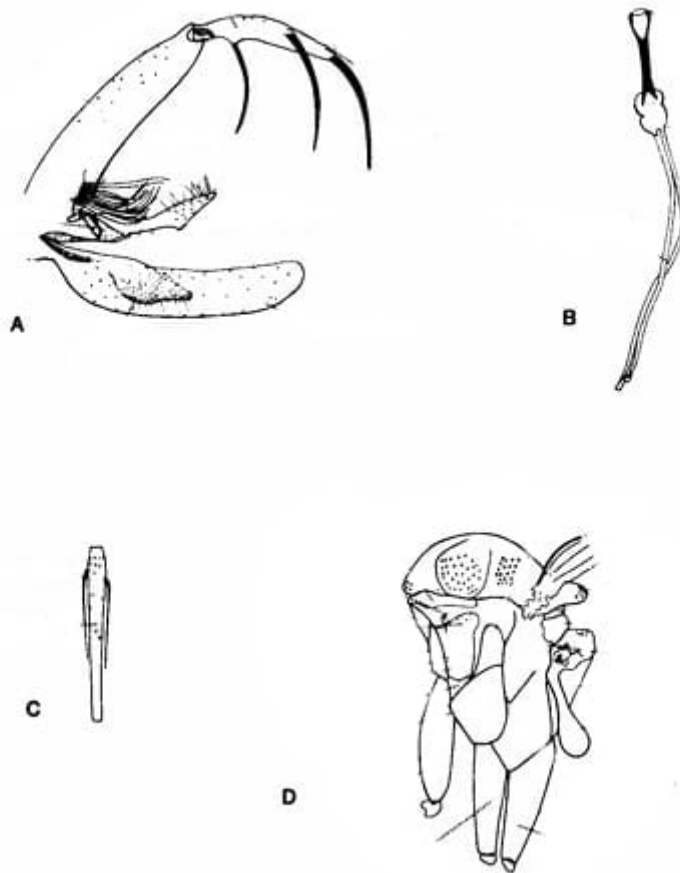


Figura 2. Morfología detallada de estructuras anatómicas de flebótomos machos (Young & Duncan, 1994). Se puede observar : A) Terminalia del macho, vista lateral. B) Bomba genital y filamentos. C) Flagelómero II con ascoides pareados. D) Tórax.

La identificación taxonómica se complementa con el análisis del patrón de setas y la morfología de los lóbulos laterales del aedeagus, características que han demostrado ser útiles para la discriminación de especies estrechamente relacionadas (Galati & Ovallos, 2012).

Clasificación Young – Duncan.

La clasificación taxonómica propuesta por (Young & Duncan, 1994) representa un hito fundamental en la sistemática de los flebótomos (Díptera: Psychodidae), estableciendo un marco metodológico riguroso basado en el análisis detallado de caracteres morfológicos. Este trabajo ha demostrado ser invaluable para la identificación precisa de especies de

importancia médica y epidemiológica, proporcionando herramientas para diferenciar especies morfológicamente similares (Ready, 2013).

Young y Duncan clasificaron a los flebótomos neotropicales en tres géneros principales: *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya*, de los cuales solo el primero tiene importancia médica e incluye aproximadamente 400 especies de las cuales muy pocas han sido incriminados como vectores.

Clasificación de flebótomos según Galati.

La clasificación de flebótomos experimentó una revolución significativa con la introducción de técnicas moleculares y análisis filogenéticos, destacándose particularmente este aporte (Galati, 1995; Galati 2003). La propuesta taxonómica de Galati representa un punto de inflexión en la sistemática de Phlebotominae, al integrar caracteres morfológicos tradicionales con un riguroso análisis cladístico, estableciendo relaciones evolutivas más precisas entre los diferentes grupos (Kato et al., 2021).

El enfoque filogenético de Galati se fundamenta en el análisis de 88 caracteres morfológicos mediante metodología cladística, lo que permitió establecer relaciones evolutivas más robustas entre los diferentes taxa. Esta metodología revolucionó la clasificación tradicional al proponer una nueva organización supragenérica de la subfamilia *Phlebotominae*, reconociendo dos tribus principales: *Hertigiini* y *Phlebotomini* (Galati et al., 2017; Galati & Ovallos, 2012). La aplicación de principios filogenéticos en su clasificación permitió una mejor comprensión de las relaciones evolutivas entre los diferentes grupos de flebótomos, superando las limitaciones de las clasificaciones previas basadas únicamente en similitudes morfológicas.

Los estudios moleculares posteriores han respaldado en gran medida la propuesta de Galati, utilizando diversos marcadores genéticos para evaluar las relaciones filogenéticas. El

análisis de genes mitocondriales como COI y Cytb, así como genes nucleares como 18S rRNA y 28S rRNA, ha proporcionado evidencia molecular que sustenta muchas de las agrupaciones propuestas por Galati (Depaquit, 2014). Estos estudios moleculares han sido particularmente valiosos para resolver relaciones entre especies crípticas y confirmar la monofilia de varios grupos taxonómicos propuestos en su clasificación.

La integración de datos moleculares ha permitido también refinar la comprensión de la evolución de caracteres morfológicos importantes. Los análisis filogenómicos recientes han revelado patrones evolutivos en estructuras como la genitalia y el cibario, que fueron fundamentales en la clasificación original de Galati. La congruencia entre los datos moleculares y morfológicos ha fortalecido la validez de muchos de los grupos propuestos, aunque también ha llevado a algunas revisiones y refinamientos de la clasificación original (Lambkin et al., 2013).

Un aspecto particularmente relevante de la clasificación molecular y filogenética moderna es su aplicación en la identificación de especies vectores y el estudio de su capacidad vectorial. Los análisis moleculares han permitido identificar marcadores genéticos asociados con la competencia vectorial y la susceptibilidad a diferentes especies de *Leishmania*, proporcionando una base molecular para entender la especificidad parásito-vector (Kamhawi, 2006).

En la actualidad, la clasificación de Galati cuenta con más aceptación al estar basada en análisis filogenéticos a nivel molecular. De esta manera, la clasificación de subgéneros de *Lutzomyia*, propuesta por Young y Duncan se cambia para elevarlos a género en la clasificación de Galati. Para fácil explicación nos referiremos al ejemplo de la especie *Lutzomyia (Nyssomyia) trapidoi*, (uno de los vectores de *Leishmania* más importantes en la costa del Ecuador), que consta así según la clasificación de Young & Duncan. Según la nueva clasificación de Galati, corresponde a *Nyssomyia trapidoi* en donde se elimina el

género *Lutzomyia* y el subgénero *Nyssomyia* se eleva a género (Galati et al., 2017). Aunque más compleja, es la clasificación actual y la que utilizaremos durante este estudio.

Leishmaniasis

Agente causal.

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoos del género *Leishmania* (Clase Kinetoplastea, familia Trypanosomatidae). Estos parásitos son microorganismos unicelulares eucariotas, dimórficos, que se caracterizan por ser parásitos intracelulares obligados que infectan principalmente las células del sistema fagocítico mononuclear, especialmente los macrófagos del sistema inmunológico (Torres-Guerrero et al., 2017). El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros principales: *Leishmania* (*Leishmania*) y *Leishmania* (*Viannia*), una clasificación basada tanto en sus características morfológicas como en su desarrollo en el intestino del vector (Ready, 2013).

Hasta la fecha, se han identificado más de 20 especies de *Leishmania* como patógenos en humanos, cuya distribución geográfica depende tanto del vector flebótomo como del reservorio animal involucrado en la transmisión.

Las diferentes especies de *Leishmania* muestran un tropismo específico por distintos tejidos del hospedador, lo que resulta en las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad. Esta especificidad está relacionada con factores tanto del parásito como del hospedador, incluyendo la respuesta inmune y factores genéticos de ambos organismos (Scott & Novais, 2016).

Manifestaciones clínicas.

Se puede encontrar diferentes formas clínicas de la enfermedad que varían de acuerdo a la especie del parásito y su distribución geográfica. Entre las más importantes están:

- Leishmaniasis cutánea (LC): es la forma más común y se caracteriza por la aparición de úlceras en la piel o lesiones nodulares en sitios de la picadura del flebótomo. Tales lesiones pueden sanar espontáneamente o progresar a formas más graves si no se tratan adecuadamente (Alvar et al., 2012). Está presente en el Ecuador y representa la mayoría de casos reportados.
- Leishmaniasis mucocutánea (LMC) : Se desarrolla a partir de la LC cuando los parásitos se diseminan a las mucosas , destruyendo tejidos nasales ,faríngeos y laríngeos , lo que puede causar desfiguración severa (Alvar et al., 2021). Está asociada a especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia* y se encuentra presente en el Ecuador, sin embargo, representa la minoría de los casos reportados.
- Leishmaniasis visceral (LV): Se denomina como kala-azar, es la forma más grave y potencialmente mortal, se caracteriza por fiebre prolongada, hepatoesplenomegalia, pérdida de peso y anemia (Burza et al., 2018). Esta forma clínica no esta presente en el Ecuador , aunque si en Colombia y Brasil.
- La literatura médica describe varias otras formas clínicas a nivel mundial que no serán mencionadas en este trabajo.

Ciclo de transmisión.

El ciclo de transmisión de *Leishmania* spp. involucra tres formas principales:

- Promastigotes procíclicos: Son las formas flageladas no infectivas que se desarrollan inicialmente en el intestino del flebótomo. Se originan cuando el vector ingiere sangre conteniendo amastigotes de un hospedador infectado (Rogers et al., 2002).
- Promastigotes metacíclicos: Representan la forma infectante que se desarrolla en la parte anterior del tubo digestivo del flebótomo, específicamente en la probóscide. Se encuentran en la saliva de la hembra y son inoculados durante la siguiente

alimentación sanguínea, iniciando la infección en el nuevo hospedador (Dostálová & Volf, 2012).

- Amastigotes: Son las formas redondeadas sin flagelo visible que se encuentran dentro de los macrófagos del huésped vertebrado. Una vez que los promastigotes metacíclicos son fagocitados, se transforman en amastigotes, donde se replican y diseminan a otros tejidos (Rogers et al., 2002). Estudios detallados del ciclo de transmisión revelan otras formas del parásito presentes como paramastigotes y nectomonas, pero no profundizaremos en este tema.

Bartonelosis humana

Agente causal.

La bartonelosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Bartonella*, un grupo de bacilos intracelulares facultativos pertenecientes a la familia Bartonellaceae, orden Rhizobiales y phylum Proteobacteria. Estas bacterias presentan un tropismo marcado por eritrocitos y células endoteliales, lo que les permite evadir la respuesta inmunitaria del hospedero y persistir en la circulación sanguínea (Navarro-Soler et al., 2025).

En América del Sur, *B. bacilliformis* es la única especie transmitida por flebótomos y es el agente etiológico de la enfermedad de Carrión. Su ciclo de vida involucra dos fases clínicas bien diferenciadas: una fase aguda hemolítica, conocida como fiebre de Oroya, y una fase crónica angioproliferativa, denominada verruga peruana (Ramón Blanco & Raoult, 2005).

La patogénesis de *B. bacilliformis* se basa en su capacidad para invadir eritrocitos a través de adhesinas específicas, lo que facilita su internalización y multiplicación en el interior del glóbulo rojo. Posteriormente, la bacteria induce hemólisis y disrupción de la integridad de la membrana celular, lo que contribuye a una anemia severa en la fase aguda (Sanchez

Clemente et al., 2012). Además, *B. bacilliformis* infecta células endoteliales, promoviendo la proliferación descontrolada de estas y la formación de neovasos, característica de la fase crónica de la enfermedad (Sorg et al., 2020).

Manifestaciones clínicas.

Las formas clínicas de la enfermedad se pueden presentar de la siguiente manera:

- Fiebre de Oroya: Se denomina la fase aguda de la infección por *B.bacilliformis*. Se caracteriza por fiebre alta, anémica hemolítica severa y hepatomegalia. Debe ser tratada oportunamente, ya que puede ser fatal debido a la destrucción masiva de eritrocitos (Maguina et al., 2001).
- Verruga Peruana : Se conoce como la fase crónica de la bartonelosis y se presentan mediante lesiones cutáneas angioproliferativas que pueden durar meses o años , tales lesiones pueden varias desde pápulas hasta nódulos grandes que pueden ulcerarse (Maguina et al., 2001).

Otras Bartonelas.

Existen otras especies de *Bartonella*, como *B. henselae*, *B.quintana* y *B. rochalimae*, que son transmitidas por otras vías o por vectores diferentes a los flebótomos, como las pulgas y garrapatas (Billeter et al., 2008). *Bartonella henselae* es agente causal de la enfermedad por arañazos de gato y se transmite mediante las pulgas de gatos (*Ctenocephalides felis*) (Zarea et al., 2023). *Bartonella quintana* está asociada con el tifus de los mendigos transmitida por piojos humanos (*Pediculus humanus corporis*) (Angelakis & Raoult, 2014). Estas especies de *Bartonella* tienen una relevancia médica de gran importancia, porque pueden causar enfermedades crónicas y generar un gran impacto en paciente inmunocomprometidos.

Situación en Ecuador

En Ecuador, se han registrado aproximadamente 80 especies de flebótomos (Shimabukuro et al., 2017), aunque estudios recientes sugieren que su diversidad podría ser mayor en ecosistemas amazónicos, donde las exploraciones entomológicas aún son limitadas (Gomez et al., 2014; Kato et al., 2021). A pesar de su relevancia epidemiológica, persisten vacíos en la identificación taxonómica de varias especies y en la caracterización de su capacidad vectorial en el país.

La leishmaniasis es una enfermedad endémica en Ecuador con mayor incidencia en la costa del Ecuador y en las estribaciones de la cordillera de los Andes. Al menos ocho especies de *Leishmania* han sido reportadas en el país (Hashiguchi et al., 2018). Sin embargo, en la costa del Ecuador las especies del grupo *Viannia* son más frecuentes (*Leishmania (V) panamensis*, *Le (V) guyanensis* y *Le(V) braziliensis* transmitidas principalmente por *Nyssomyia trapidoi* y *Lutzomyia gomezi* (Barrera et al., 1994; Mouchet et al., 1994; Zapata et al., 2012). Otras especies como *Lu. reburra*, *Lu. barretoii majuscula* y *Lu. hartmanni* han sido reportadas como posibles vectores (Arrivillaga-Henríquez et al., 2017; Quiroga et al., 2017a). Más estudios son necesarios para complementar estos resultados y confirmar la capacidad vectorial de estas especies.

Según datos epidemiológicos del Ecuador en 2024 , se notificaron 1030 casos de leishmaniasis confirmados, de los cuales 1010 (98.058%) correspondieron a leishmaniasis cutánea y al menos 20 (1.941%) a la forma mucocutánea. En el año 2023 fue algo similar con 1.040 casos confirmados de leishmaniasis, de la forma cutánea 1.011 casos (97,21%) y 29 casos de la forma mucocutánea (2,78%) (Subsecretaría de Vigilancia, Prevención y Control de la Salud, Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ecuador, 2024). En cuanto a los casos reportados en provincias cercanas a Bucay, se han documentado 40 casos clínicamente confirmados de leishmaniasis en Chimborazo entre 2013 y 2022, concentrados

principalmente en el cantón Alausí, que colinda con el área de estudio (Jumbo & Ruiz, 2023). En el 2024, un total de 25 casos de leishmaniasis se reportaron de estas 3 provincias (Subsecretaría de Vigilancia, Prevención y Control de la Salud, Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ecuador, 2024), sin embargo, no se dispone de información reciente más específica sobre la situación epidemiológica de leishmaniasis en esta zona. Dada la ubicación geográfica de Bucay, donde confluyen los límites de estas tres provincias, se resalta la importancia de una vigilancia epidemiológica más exhaustiva en esta zona de transición ecológica.

La bartonelosis o enfermedad de Carrión, ha sido históricamente endémica en el Ecuador, se han documentado casos esporádicos en provincias fronterizas como Zamora-Chinchipe (Guapulema et al., 2024). Un estudio reciente en el sur del país identificó la presencia de *L. verrucarum* en áreas con alta incidencia de fiebre de Oroya, lo que sugiere su posible rol en la transmisión local de *B. bacilliformis* (Herrera et al., 2024).

Hasta la semana epidemiológica 52 de 2024, no se han reportado casos confirmados de bartonelosis en Ecuador, sin embargo, se notificaron dos casos del 2022. (Subsecretaría de Vigilancia, Prevención y Control de la Salud, Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ecuador, 2024). Se enfatiza la importancia de la vigilancia epidemiológica activa debido al riesgo de introducción de casos importados desde regiones endémicas del norte de Perú (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2023).

Además de su papel en la transmisión de *Leishmania* y *Bartonella*, los flebótomos han sido implicados como vectores de diversos arbovirus de importancia médica. Entre los virus asociados a estos insectos se encuentran el virus de *Paraíso Escondido*, el *Sandfly fever virus* (SFV), el *Chandipura virus* (CHPV) y el *Changuinola virus* (CGLV), este último considerado el único arbovirus del Nuevo Mundo reportado hasta la fecha en Panamá (Maroli et al., 2013; Phan et al., 2020).

El virus de *Paraíso Escondido* ha sido detectado en flebótomos recolectados en Ecuador por investigadores de la USFQ (Alkan et al., 2015) aunque su relevancia epidemiológica aún no ha sido completamente elucidada. Estudios recientes sugieren su mantenimiento en ciclos zoonóticos con mamíferos reservorios en hábitats selváticos (Marklewitz et al., 2019)..

Objetivo general

- Caracterizar la fauna de flebótomos presentes en los alrededores de la población de Bucay, (confluencia de las provincias del Guayas, Chimborazo y Cañar) en las estribaciones occidentales de los Andes al sur del Ecuador y examinar la infección natural por *Leishmania* spp. y *Bartonella* spp. mediante pruebas moleculares.

Objetivos específicos

- Identificar especies de flebótomos recolectados (tanto machos como hembras) mediante taxonomía clásica y claves especializadas (Galati, 2003; Young & Duncan, 1994).
- Determinar la infección natural de *Leishmania* spp. y *Bartonella* spp. en las hembras de flebótomos mediante PCR.

METODOLOGÍA

Área de estudio

El presente estudio se realizó con muestras colectadas en los alrededores de la población de Bucay, provincia del Guayas. En esta región confluyen las provincias del Guayas, Chimborazo y Cañar. Para las colectas se seleccionaron dos lugares de muestreo correspondientes a zona de bosque secundario, ambos pertenecientes al mismo tipo de bosque, según el (Ministerio del Ambiente, 2012) es conocido como Bosque Húmedo Montano Bajo. Tales sitios son los siguientes:

(1) En la provincia de Chimborazo, en el cantón Cumandá, en bosque, parte de una hacienda privada denominada "Pilar"

(2) En la provincia de Cañar, en la zona de la población de San Juan, en un bosque cerca de la carretera principal que comunica la población de San Juan con Cumandá.

El muestreo se realizó durante el año 2023 en ambos sitios de colección. En la tabla se proporciona datos ecológicos de los dos sitios de muestreo.

Tabla 1. Caracterización ecológica de los sitios de muestreo

Sitio de muestreo	Provincia	Altitud (msnm)	Temperatura promedio anual (°C)	Precipitación promedio anual (mm)	Tipo de bosque según MAATE	Coordenadas
Hacienda Pilar	Chimborazo	264	22-24	2000-3000	Bosque Húmedo Montano Bajo	2°13'51"S 79°10'14"W
San Juan	Cañar	413	20-22	1800-2800	Bosque Húmedo Montano Bajo	2°14'36"S 79°07'48"W

Colecta de especímenes

Los especímenes de flebótomos fueron colectados como parte de un proyecto de investigación de mayor escala financiado por el instituto NAMRU-SOUTH (Entomological surveillance in Ecuador – characterization of sand fly, tick, triatomine and mosquito vectors in Southern Ecuador near the border with Peru) para realizar monitoreos entomológicos de vectores en el sur del país. Las colectas entomológicas se realizaron en peridomicilios y sus alrededores. Se emplearon trampas de luz CDC, las cuales permanecieron operativas durante aproximadamente 12 horas, desde las 18:00 hasta la mañana siguiente, cuando fueron retiradas las fundas colectoras de muestras. Se complementó las colectas con cebo humano protegido que se realizó en la noche de 19:00-21:00 horas.

Montaje y clasificación de los especímenes

Las muestras obtenidas en campo fueron inmediatamente almacenadas a -20°C en un congelador para matar a los especímenes. Posteriormente, se trasladaron a envases con etanol al 70% para su posterior análisis. Las colecciones fueron examinadas mediante un estereomicroscopio, donde se separaron los flebótomos sin distinción de sexo. Los especímenes se almacenaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml con etanol al 70% para su posterior análisis. En este estudio, se trabajó con machos y hembras de flebótomos, las cuales fueron montadas según el siguiente procedimiento: los especímenes fueron colocados en un portaobjetos con una gota de alcohol. Se realizó la disección de la cabeza, alas y los últimos segmentos abdominales utilizando un estereomicroscopio y agujas estériles. El resto del cuerpo se almacenó en etanol al 70%. Las partes diseccionadas fueron transferidas a otra placa y tratadas con una gota de solución Marc-André (compuesta por 40 g de hidrato de cloral, 30 ml de ácido acético glacial y 30 ml de agua destilada) y se dejaron reposar durante aproximadamente 5 min. Posteriormente, el portaobjetos fue sometido a calor mediante la

llama de un encendedor por fracción de segundos, así evitando la evaporación total de la solución, con el fin de clarificar las estructuras anatómicas. Las estructuras clarificadas fueron dispuestas en el portaobjetos con una gota de goma cloral y se cubrieron con un cubreobjetos para finalizar el montaje. Finalmente, la identificación taxonómica se realizó mediante claves dicotómica específicas para flebótomos, la cual permite la determinación de hembras de flebótomos con base en características morfológicas como la espermateca, el cibario y otras estructuras distintivas y para machos mediante partes de su genitalia como el gonoestilo, gonocoxite, parámero, lóbulo lateral, aedeagus, bomba y filamentos genitales. Aunque ambas claves fueron usadas, este trabajo utiliza la nomenclatura de las especies de flebótomos según (Galati, 2003) que es la más actualizada. Es importante mencionar que no se prepararon placas de especímenes voucher para esta investigación, ya que las especies encontradas son comunes y se han recolectado en otros sitios.

Extracción de ADN y reacción de cadena polimerasa (PCR)

Se extrajo ADN total de las muestras individuales y pools de las hembras de la misma especie recolectados en el mismo sitio de muestreo, con el objetivo de incrementar la concentración de ADN parasitario. La extracción se realizó utilizando el kit DNeasy Blood and Tissue Mini Spin Column (Qiagen), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Cada extracción generó un volumen final de 25 µL de ADN.

Amplificación por PCR de *Leishmania* spp y *Bartonella* spp.

Para la amplificación del ADN de *Leishmania* spp., se seleccionó la región del gen mitocondrial LCM, utilizando los primers universales L.MC-1S (5'–CTRGGGGTTGGTGTAATAAG–3') y L.MC-1R (5'–TWTGAACGGGRTTCTG–3'), que amplifican un fragmento de aproximadamente 700 pb (Kato et al., 2005). En el caso de *Bartonella* spp., se amplificó el gen ITS con los primers universales 325s (5'–

CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTTTGCG–3') y 1100as (5'–GAACCGACGACCCCCTGCTTGCAA–3'), que generan un producto de entre 300 y 500 pb (Billeter et al., 2011).

La reacción de PCR para *Leishmania* spp., se realizó en un volumen final de 25 µL, compuesto por: 5 µL de Green GoTaq® Reaction Buffer 5X, 1.5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL de dNTPs (10 mM), 0.5 µL de cada primer (20 µM), 0.25 unidades de GoTaq® DNA Polymerase, 15.75 µL de agua libre de nucleasas, y 1 µL de ADN extraído. Para *Bartonella* spp., la mezcla también tuvo un volumen final de 25 µL, pero con los siguientes componentes: 5 µL de Flexi Taq® Reaction Buffer 5X, 1.5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL de dNTPs (10 mM), 0.5 µL del primer ITS Forward (20 µM), 0.5 µL del primer ITS Reverse (20 µM), 0.2 µL de Platinum Taq, 15.8 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de ADN extraído.

Las condiciones térmicas para la amplificación de *Leishmania* spp., siguieron el protocolo de (Hebert et al., 2003) iniciando con una desnaturalización a 95 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 10 minutos, con una extensión final de 72 °C por 10 minutos. En contraste, el protocolo para *Bartonella* spp., mediante el protocolo de (Padilla R & Ventura E, 2003) comenzó con un paso de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, finalizando con una extensión a 72 °C durante 7 minutos.

Visualización de productos de PCR convencional para *Leishmania* spp. y *Bartonella* spp.

Los productos de PCR convencional realizada para *Leishmania* spp. y *Bartonella* spp fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 %, a 80 V durante 45 minutos. La visualización se realizó en un transiluminador FastGene con luz LED azul, y el tamaño de los

amplicones fue estimado utilizando el marcador molecular TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

PCR anidada para *Bartonella* spp.

La técnica de PCR anidada se utilizó como segundo paso para confirmar los resultados obtenidos mediante PCR convencional en la detección de *Bartonella* spp., específicamente amplificando el gen de la Citrato Sintasa (*gltA*). Esta técnica se llevó a cabo en dos rondas de amplificación sucesivas utilizando dos pares de cebadores diferentes como menciona (Rampersad et al., 2005).

En la primera ronda, se emplearon los cebadores 443f (5'-GCTATGTCTGCATTC TATCA - 3') y 1210r (5'- GATCYTCAATCATTTCTTTCCA - 3'), con un volumen final de reacción de 25 µL compuesto por 5 µL de Flexi Taq® Reaction Buffer 5X, 1.5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL de dNTPs (10 mM), 0.5 µL de cada cebador (20 µM), 0.2 µL de Go Taq® DNA Polymerase, 15.8 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de ADN extraído. Las condiciones del termociclador incluyeron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 48 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 2 minutos, finalizando con una extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

En la segunda ronda, se utilizaron los cebadores internos BhCS.781p (5'- GGG GACCAGCTCATGGTGG - 3') y BhCS.1137n (5'- AAATGCAAAAAGAACAGTAAA CA - 3'). La mezcla de reacción tuvo un volumen final de 25 µL, compuesta por 20 µL de Master Mix (que incluye buffer, MgCl₂, dNTPs, cebadores y Taq polimerasa) y 5 µL del amplicón del primer round como molde. El protocolo térmico consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización

a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 55 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 2 minutos, con una extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Cuantificación del ADN

Para evaluar la concentración y calidad del ADN extraído, se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop 2000™. Primero, se activó el software correspondiente y se aplicaron 2 µL de agua libre de nucleasas para limpiar la superficie de medición. Posteriormente, se utilizó 2 µL de buffer de elución AE como blanco para la calibración del equipo. Luego, se depositaron 2 µL de cada muestra de ADN en la plataforma de medición y se registraron los valores de absorbancia en las longitudes de onda de 260 y 280 nm. Este procedimiento se repitió para todas las muestras procesadas en el estudio.

Análisis de datos

Los datos obtenidos en este estudio fueron organizados y analizados para determinar la diversidad y composición de especies de flebótomos en las provincias de Chimborazo y Cañar. La identificación taxonómica de los especímenes se realizó con las claves dicotómicas de (Galati , 1995) registrando la frecuencia de cada especie en cada localidad de muestreo. Para evaluar la diversidad de especies en los sitios de colecta, se calculó el índice de Shannon-Wiener (H'), permitiendo comparar la heterogeneidad de las comunidades de flebótomos entre las dos localidades de estudio.

Para la evaluación de la calidad del ADN, se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop 2000™, midiendo la concentración y pureza del ADN a partir de las relaciones de absorbancia 260/280 nm corresponde a 1.8 y 2.0 (presencia de contaminantes como proteínas) mientras que 260/230 nm corresponde a 2.0 y 2.2 (presencia de contaminantes como compuestos orgánicos). Se verificó que las muestras cumplieran con los estándares de calidad para su posterior análisis mediante PCR (García-Alegría et al., 2020).

Los productos amplificados por PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, aplicando un voltaje de 80 V durante 45 min. Se verificó la presencia de bandas esperadas según el tamaño del amplicón y se compararon con un marcador molecular TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). Se determinó la presencia de *Leishmania* spp. y *Bartonella* spp. en las muestras analizadas.

RESULTADOS

Fauna y abundancia de flebótomos

Se recolectaron un total de 347 flebótomos durante el año 2023, de los cuales 196 (56.48 %) fueron hembras y 151 (43.52 %) machos. La identificación taxonómica permitió clasificar 216 individuos a nivel de especie (62.25 %), distribuidos en al menos 12 especies. *Psychodopygus carrerai* fue la especie más abundante con 82 individuos, seguida de *Psathyromyia aclydifera* (62), *Psychodopygus panamensis* (24) y *Nyssomyia trapidoi* (21). Otras especies como *Lutzomyia gomezi*, *Pressatia* sp., *Brumptomyia* sp. y *Lutzomyia shannoni* estuvieron presentes en menores cantidades (Tabla 3).

Tabla 2. Abundancia de flebótomos por especie y provincia

	CHIMBORAZO			CAÑAR				
Especie	Machos	Hembras	Subtotal	Machos	Hembras	Subtotal	Total	Bartonella (+)
<i>Psychodopygus panamensis</i>	2	12	14	2	8	10	24	+
<i>Psychodopygus carrerai</i>	9	22	31	13	38	51	82	-
<i>Psathyromyia aclydifera</i>	0	24	24	0	38	38	62	+
<i>Nyssomyia trapidoi</i>	11	3	14	1	6	7	21	-
<i>Lutzomyia gomezi</i>	0	1	1	1	9	10	11	-
<i>Pressatia</i> sp.	3	0	3	1	1	2	5	-
<i>Psychodopygus barretoii majuscula</i>	0	1	1	0	1	1	2	-
<i>Brumptomyia</i> sp.	0	2	2	1	0	1	3	-
<i>Yuilli yuilli</i>	0	1	1	1	0	1	2	-
<i>Lutzomyia shannoni</i>	0	1	1	1	0	1	2	-
Desconocidos	1	0	1	1	1	2	3	
No identificados	68	15	83	36	11	47	130	
Total	94	82	176	58	113	171	347	

La abundancia relativa de las especies de flebótomos recolectadas en cada provincia. Se observa que la composición varía entre localidades, siendo *Psychodopygus carrerai* la especie dominante en Cañar, mientras que Chimborazo presenta una comunidad con mayor distribución entre especies (Figura 3).

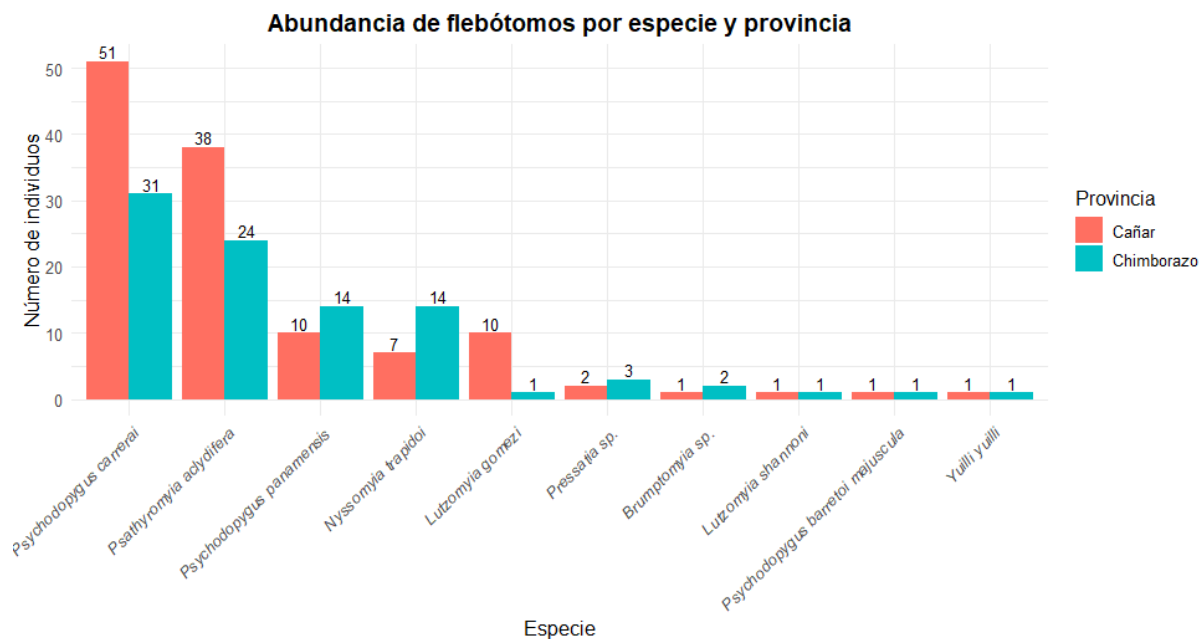


Figura 3. Abundancia de flebótomos por especie y provincia

Indices ecológicos

La comparación de los índices ecológicos de Shannon-Wiener (H'), riqueza específica (S) y equidad (J') entre las provincias de Chimborazo y Cañar muestra diferencias en diversidad ecológica. En Chimborazo se obtuvo un índice de Shannon de $H' = 1.683$, una riqueza de $S = 11$ especies y una equidad de $J' = 0.678$. En Cañar, el índice fue de $H' = 1.503$, con riqueza de $S = 9$ especies y una equidad de $J' = 0.653$ (Figura 4).

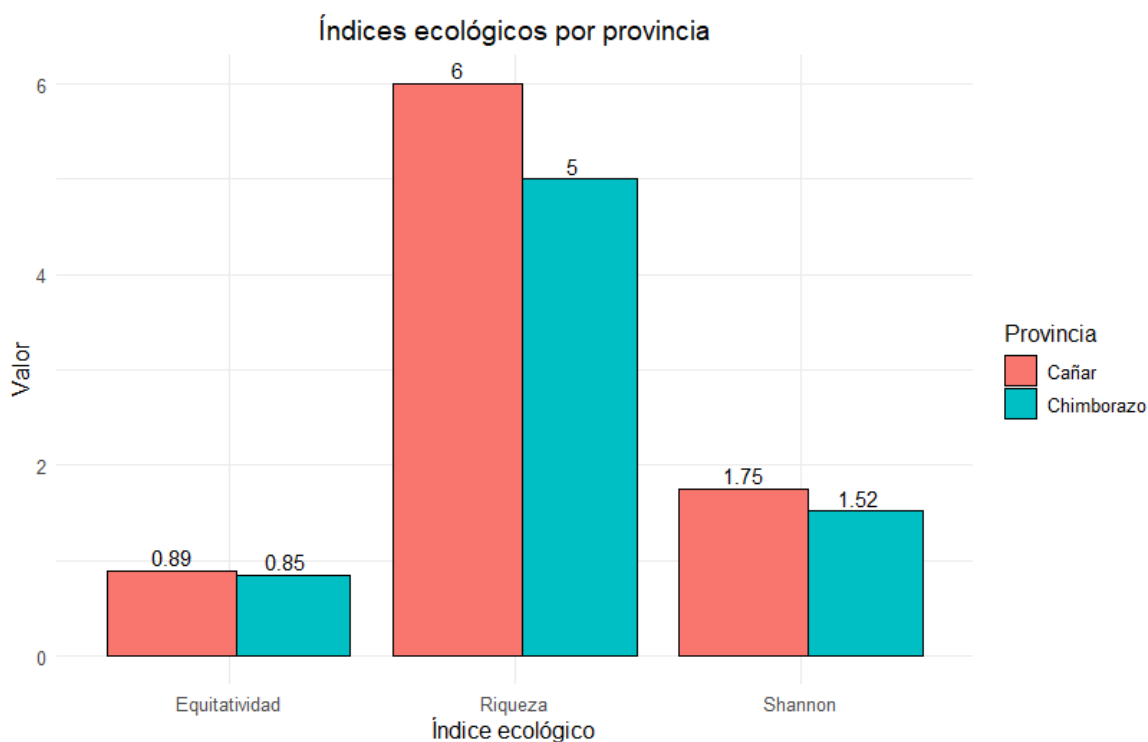


Figura 4. Índice ecológicos por provincia

Extracción y cuantificación de ADN

Se realizaron extracciones de ADN total (25 μL) a partir de 7 pools conformados por especies de flebótomos recolectadas en un mismo sitio de muestreo, así como de 21 muestras individuales, obteniendo un total de 28 extracciones de ADN. En la Tabla 3 se detallan los resultados de la cuantificación del ADN extraído. Las concentraciones obtenidas oscilaron entre 0.2 y 32.7 ng/ μL . Asimismo, los valores de las relaciones de absorción 260/280 se ubicaron entre 1.29 y 4.27, mientras que los valores de 260/230 variaron entre 0.34 y 3.41, lo cual evidencia diferencias en la pureza del ADN entre las muestras.

Tabla 3. Cuantificación de ADN en muestras de Chimborazo y Cañar.

Código	Muestras	ng/ μL	A260/A280	A260/A230
-	Buffer	0,3	-4,25	95,53
Pool 1	Muestra 1	26	2,22	2,59
Pool 2	Muestra 2	5,6	2,73	3,41
Pool 3	Muestra 3	17,6	2,25	2,46
Pool 4	Muestra 4	8,4	2,29	1,68
Pool 5	Muestra 5	7,1	2,53	2,56
Pool 6	Muestra 6	15,1	2,34	2,29

Pool 7	Muestra 7	32,7	2,24	2,59
F11+SJ (5)	Muestra 8	1,7	2,63	0,69
F11+ SJ (2)	Muestra 9	2,8	2,3	0,63
F11+SJ (1)	Muestra 10	2,7	1,43	0,91
F11+HP (3)	Muestra 11	2,7	2,52	3,9
F11+SJ (13)	Muestra 12	7,1	2,22	1,38
F11+SJ (29)	Muestra 13	3,2	1,98	0,72
F11+ SJ (28)	Muestra 14	8,5	2,61	2,08
F11+ SJ (26)	Muestra 15	2,1	2,52	1,4
F11 + SJ (24)	Muestra 16	5,1	1,82	1,34
F5 + HP (1)	Muestra 17	4,8	2,17	1,35
F5 + HP (13)	Muestra 18	3,3	2,41	0,6
F4 + HP (12)	Muestra 19	5,1	2,43	1,35
F4 + HP (11)	Muestra 20	3,5	2,16	2,2
F4 + HP (10)	Muestra 21	5	1,89	0,83
F4 + HP (6)	Muestra 22	6,6	2,19	0,29
F4 + HP (4)	Muestra 23	5	2,08	0,65
F4+ HP (2)	Muestra 24	4,8	2,1	1,15
F11+ SJ (1)	Muestra 25	3,2	3,46	0,44
F11 + SJ (21)	Muestra 26	2	2,32	0,88
F11 + SJ (8)	Muestra 27	4,1	2,4	0,19
F11 + SJ (6)	Muestra 28	2,2	3,13	0,34

Reacción de cadena polimerasa y Nested PCR

Con las 28 muestras de ADN de flebótomos, todas las muestras se amplificaron tanto para *Leishmania* spp. y *Bartonella* spp. Se comenzó con la detección de *Leishmania* spp., colocándo 24 muestras en el gel con un control positivo. Se puede ver que no hay ninguna banda visible y solo se puede observar el Ladder de (100pb) como referencia (Figura 6).

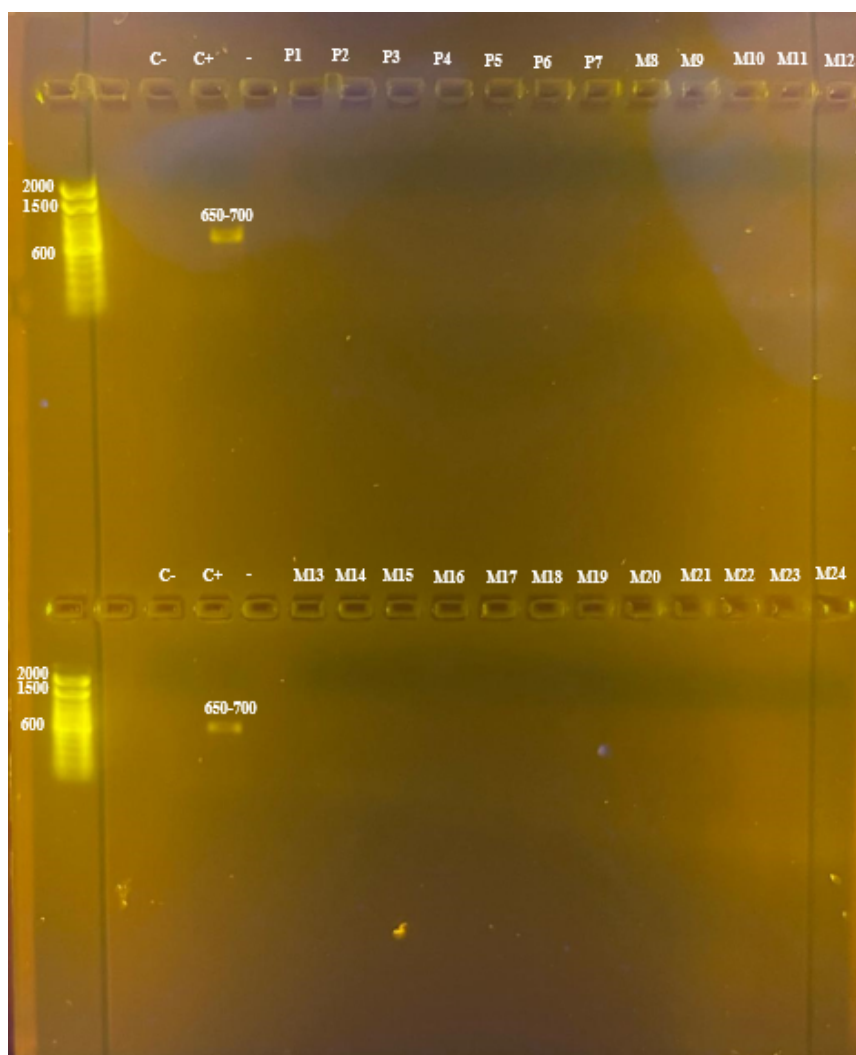


Figura 5. Amplificación del gen LCM para la detección de *Leishmania* spp.

Para *Bartonella* spp. se aplicó las 24 muestras en el gel , junto dos controles positivos. Se observó tres muestras presentaron bandas amplificadas con un tamaño aproximadamente de 600 pb en referencia al Ladder de (100 pb) (Figura 7) , lo que indica una presencia positiva de *Bartonella* spp. en dichos flebótomos.

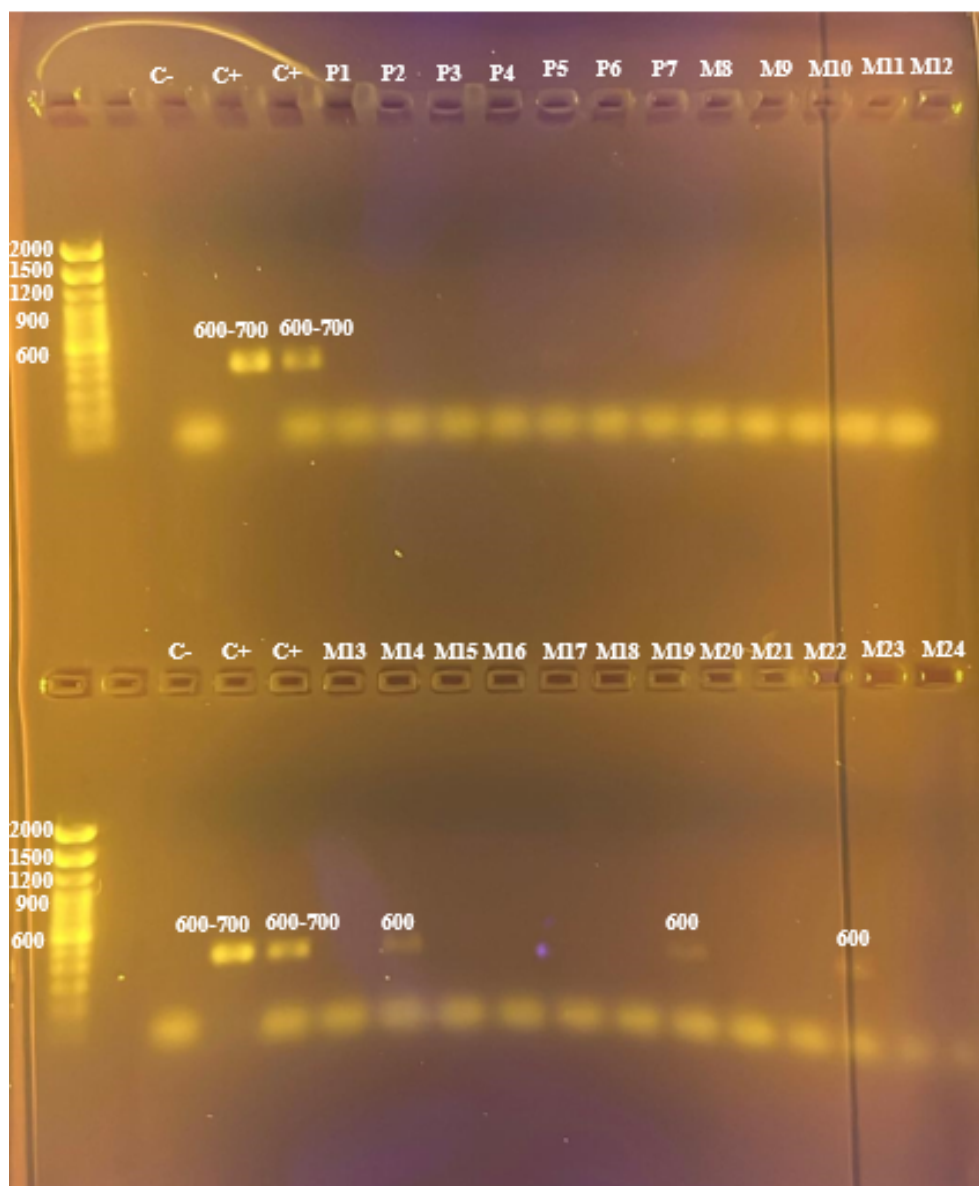


Figura 6. Amplificación del gen ITS para la detección de *Bartonella* spp.

Al ser 28 muestras se usó un gel compartido, en la parte superior se colocó las 8 muestras restantes de *Leishmania* spp. y en la parte inferior se colocó las 8 muestras restantes de *Bartonella* spp. Demostrando que no existe ninguna amplificación en a las últimas muestras para este gel (Figura 8).

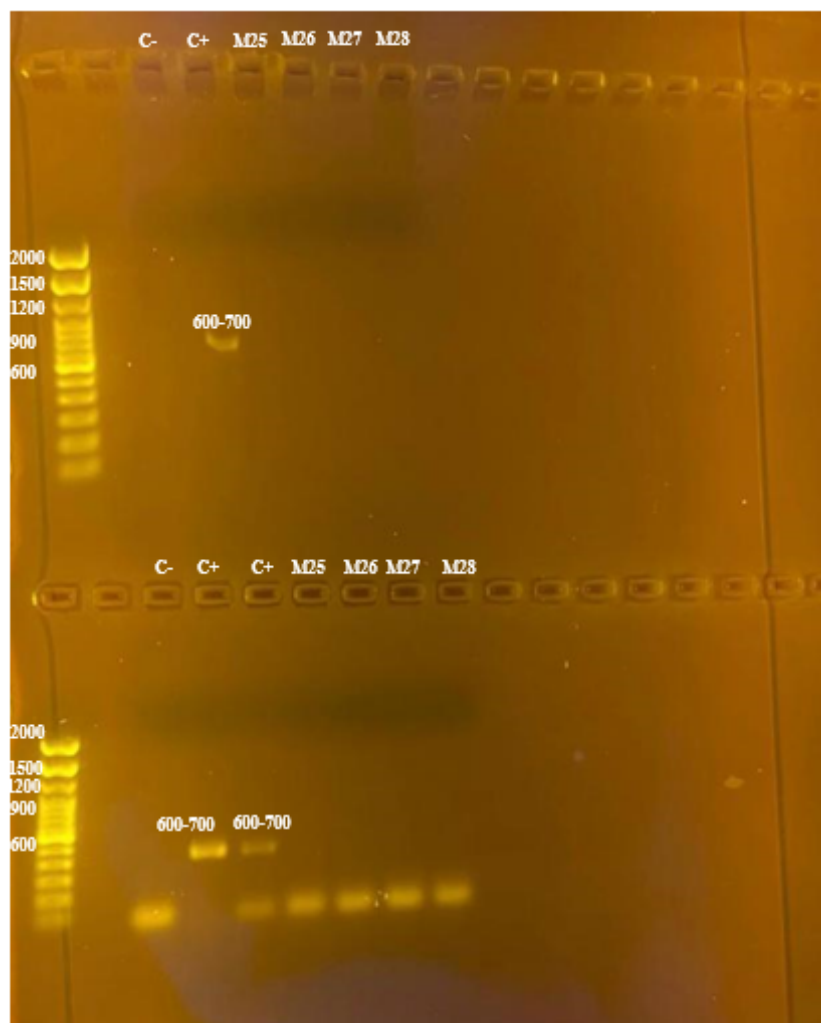


Figura 7. Amplificación del gen LMC e ITS para la detección de *Leishmania* spp y *Bartonella* spp.

Posteriormente , se confirmó mediante otra PCR convencional ,utilizando las tres muestras positivas juntos a tres muestras negativas , con el fin de descartar falsos positivos (Figura 9).

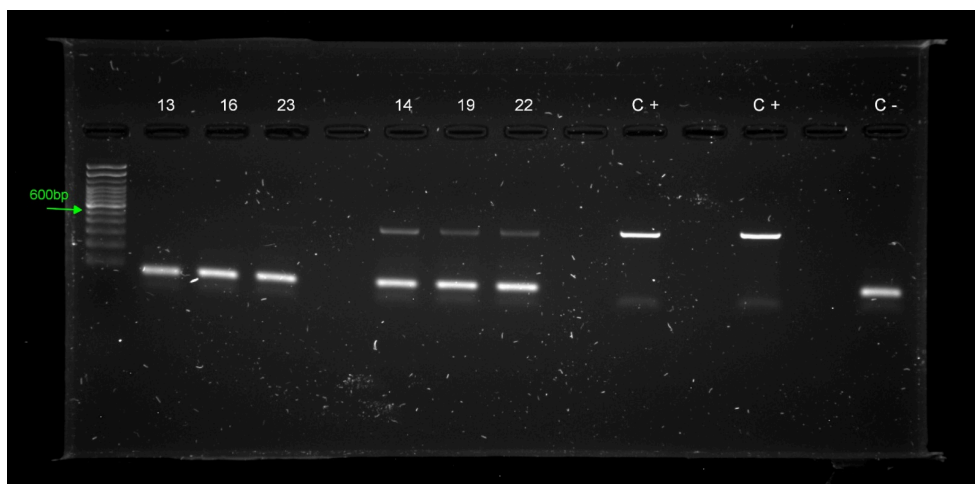


Figura 8. Amplificación de verificación de *Bartonella* spp.

Con los resultados positivos para *Bartonella* spp., se hizo la amplificación del Nested PCR, donde se usaron las tres muestras positivas obtenidas en la PCR convencional. Se pudo ver que en el carril de la muestra 14 hay una banda claramente definida alrededor de los 700 pb, correspondiente al tamaño esperado para el fragmento amplificado, lo que confirma la presencia de *Bartonella* spp, sin embargo, en los carriles correspondiente a las muestras 19 y 22 no presentan bandas visibles o muestran señales extremadamente tenues, por lo que se puede considerar como negativas o no concluyentes bajo las condiciones de amplificación empleadas (Figura 10).

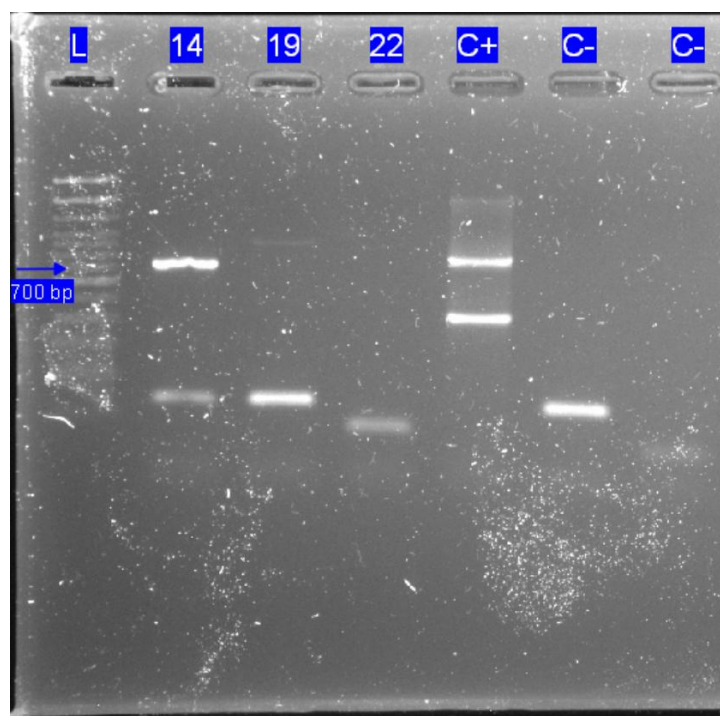


Figura 9. Amplificación mediante PCR anidada de las muestras de *Bartonella* spp

DISCUSIÓN

Este estudio constituye un aporte importante al conocimiento de la entomofauna de flebótomos en una zona subrepresentada del Ecuador. La identificación de once especies distintas, incluyendo vectores conocidos como *Nyssomyia trapidoi* y *Lutzomyia gomezi*, confirma la relevancia epidemiológica de los alrededores de Bucay. Resultados similares se han obtenido en estudios realizados en la costa ecuatoriana y zonas interandinas, donde dichas especies han sido implicadas en la transmisión de *Leishmania (Viannia)* spp. (Barrera et al., 1994; Quiroga et al., 2017).

La dominancia de especies como *Psychodopygus carrerai* (n = 82) y *Psathyromyia aclydifera* (n=62) sugiere condiciones ecológicas particulares que favorecen su presencia. Mientras que *Ps. carrerai* ya ha sido reportada en otras zonas tropicales del país, *Pa. aclydifera* ha sido menos documentada, por lo que su abundancia en esta zona resalta la necesidad de estudiar su posible rol vectorial. Esta composición difiere parcialmente de la observada por (Goenaga-Mafud et al., 2020) en Colombia, donde predominaban otras especies del grupo *Lutzomyia*.

La predominancia del género *Psychodopygus* específicamente *Ps panamensis* y *Ps carrerai* es notoria y se diferencia de colectas en sitios de la costa norte de Ecuador y estribaciones de la cordillera de los Andes hacia el norte del país. Dos subespecies, *Ps carrerai carrerai* y *Ps carrerai thula* han sido reportadas presentes en la región Amazónica y costa del Ecuador respectivamente (Calvopina et al., 2004; Quiroga et al., 2017). Estudios futuros a nivel molecular de especímenes de esta especie y sus subespecies en varias regiones del país podrían ser un aporte valioso considerando *Ps. carrerai* ha sido incriminado en la transmisión de *Le. (V) braziliensis* (Quiroga et al., 2017).

Los índices ecológicos obtenidos muestran que Chimborazo presentó mayor diversidad y equidad ($H' = 1.683$; $S = 12$; $J' = 0.678$) en comparación con Cañar ($H' = 1.503$; $S = 9$; $J' = 0.653$). Tal diferencia indica que los ambientes menos intervenidos o mas heterogéneos ofrecen condiciones mas favorables para una comunidad de flebótomos más diversa y balanceada. Estos patrones coinciden con lo reportado por (Bravo-Barriga et al., 2022; Quiroga et al., 2017; Shimabukuro et al., 2017), quienes destacan el papel de la altitud , cobertura vegetal y microclima en la estructura de las comunidades flebotomíneas.

Respecto a la detección molecular de patógenos, la ausencia de *Leishmania spp.* en las muestras analizadas puede tener varias explicaciones. Por un lado, la prevalencia de infección en vectores silvestres puede ser baja y estacional (Ready, 2013). Además, las técnicas empleadas (aunque ampliamente validadas) podrían tener limitaciones en cuanto a sensibilidad si la carga parasitaria es mínima (Kato et al., 2005). Sin embargo, estudios similares en Ecuador han logrado detecciones positivas en condiciones comparables (Quiroga et al., 2017), por lo que se sugiere repetir el muestreo en otras estaciones del año y aumentar el número de especímenes analizados.

Por otro lado, la detección de *Bartonella spp.* en tres muestras mediante PCR convencional y la confirmación parcial por Nested PCR. Las muestras positivas correspondieron a *Ps panamensis* y *Pa aclydifera* , especies que no han sido reconocidas como vectores tradicionales de *Bartonella bacilliformis* , lo que convierte este hallazgo en una posible alerta epidemiológica en la zona . La secuenciación de los productos de PCR permitirá identificar a nivel de especie de *Bartonella* y dar más luz sobre la importancia de este hallazgo. En Perú , *Lu. verrucarum* y *Lu. peruensis* son los principales vectores de bartonelosis en regiones endémicas como Ancash y Cajamarca (Carrasco, 2017). La presencia de ADN de *Bartonella* en flebótomos colectados en Bucay plantea la posibilidad de

circulación silvestre del patógeno o la existencia de nuevos vectores potenciales, lo cual amerita estudios más detallados. Este hallazgo coincide con la alerta emitida por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador (2023) que advierte sobre el riesgo de reemergencia de la enfermedad de Carrión. La vigilancia entomológica en regiones andinas se vuelve prioritaria, y los estudios moleculares deben extenderse a humanos, reservorios y vectores.

El uso combinado de taxonomía morfológica y herramientas moleculares fue clave para lograr una caracterización robusta de las especies presentes. Esta aproximación ha sido recomendada por Depaquit (2014) y Rodrigues (2023) especialmente para abordar el problema de las especies crípticas, cuya diferenciación morfológica es limitada. Sin embargo, una limitación importante de este estudio fue la ausencia de secuenciación de los productos PCR positivos, lo cual habría permitido confirmar con mayor precisión la especie bacteriana detectada. Se plantea como parte de las siguientes fases del estudio la secuenciación de los productos positivos, lo que representará un aporte importante para la epidemiología molecular de *Bartonella* spp. en zonas altoandinas del Ecuador.

Finalmente, los resultados obtenidos tienen implicaciones prácticas directas. Sirven como base para reforzar programas de vigilancia entomológica en la región, y demuestran la necesidad de fortalecer capacidades locales en diagnóstico molecular. Desde una perspectiva científica, estos hallazgos contribuyen al conocimiento sobre la ecología de vectores y la posible emergencia de nuevas enfermedades transmitidas por flebótomos en contexto geográficos y climáticos cambiantes.

CONCLUSIONES

Este estudio permitió documentar la diversidad de flebótomos en los alrededores de Bucay, identificando especies relevantes como *Nyssomyia trapidoi* y *Lutzomyia gomezi*, asociadas a la transmisión de *Leishmania* spp. La abundancia de *Ps panamensis* y *Ps carrerai* en la zona debe ser estudiada más a profundidad y considerados como posibles vectores a nivel local. Las muestras de infección positivas para *Bartonella* spp correspondieron a *Ps panamensis* y *Pa. aclydifera*, especies que no han sido reconocidas como vectores tradicionales de *Bartonella bacilliformis*. Estudios futuros podrían incluir a *Leishmania* y *Bartonella* en los monitoreos de infección de flebótomos y expandir las colectas a zonas peri e intradomiciliares para conocer mejor la fauna de flebótomos antropofílica de la zona lo que podría aportar a conocer mejor la dinámica de transmisión de enfermedades. Si bien no se detectó *Leishmania*, la presencia de ADN de *Bartonella* spp. en algunas muestras representa un hallazgo importante, con implicaciones para la vigilancia epidemiológica en el país.

En comparación con estudios realizados en otras regiones de Ecuador y países vecinos como Perú y Colombia, la composición de especies encontrada muestra tanto similitudes como diferencias, posiblemente influenciadas por las condiciones ecológicas únicas de la zona de estudio. Este trabajo reafirma la necesidad de monitorear regiones de transición biogeográfica donde puede haber circulación de vectores poco estudiados.

Desde una perspectiva profesional y formativa, este proyecto fortaleció mis competencias en técnicas de laboratorio, taxonomía entomológica y análisis científico. Enfrenté desafíos como la optimización de técnicas moleculares y la logística en el trabajo de campo, los cuales resolví mediante investigación y asesoría técnica.

A futuro, se recomienda ampliar el muestreo a otras estaciones del año, aplicar secuenciación para confirmar los patógenos detectados y crear una colección de referencia de especies. Estos esfuerzos contribuirán al conocimiento científico y a la salud pública en el contexto nacional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkan, C., Zapata, S., Bichaud, L., Moureau, G., Lemey, P., Firth, A. E., Gritsun, T. S., Gould, E. A., De Lamballerie, X., Depaquit, J., & Charrel, R. N. (2015). Ecuador Paraiso Escondido Virus, a New Flavivirus Isolated from New World Sand Flies in Ecuador, Is the First Representative of a Novel Clade in the Genus Flavivirus. *Journal of Virology*, 89(23), 11773-11785. <https://doi.org/10.1128/JVI.01543-15>
- Altagracia-Martínez, M., Kravzov-Jinich, J., Moreno-Bonett, C., López-Naranjo, F., & Martínez-Núñez Juan, M. (2012). Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud (DCBS), Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. *Rev Mex Cienc Farm.*
- Alvar, J., Den Boer, M., & Dagne, D. A. (2021). Towards the elimination of visceral leishmaniasis as a public health problem in east Africa: Reflections on an enhanced control strategy and a call for action. *The Lancet Global Health*, 9(12), e1763-e1769. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(21\)00392-2](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(21)00392-2)
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer, M. D., & the WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 7(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Angelakis, E., & Raoult, D. (2014). Pathogenicity and treatment of Bartonella infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(1), 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.04.006>
- Arrivillaga-Henríquez, J., Enríquez, S., Romero, V., Echeverría, G., Pérez-Barrera, J., Poveda, A., Navarro, J.-C., Warburg, A., & Benítez, W. (2017). Eco-epidemiological aspects, natural detection and molecular identification of Leishmania spp. In

- Lutzomyia reburra, Lutzomyia barrettoii majuscula and Lutzomyia trapidoi. *Biomédica*, 37(Sup. 2), Article Sup. 2. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.3536>
- Barrera, C., Herrera, M., Martinez, F., Leon, R., Richard, A., Guderian, R. H., Mouchet, J., Echeverria, R., & Le Pont, F. (1994). Leishmaniose en Equateur. 1. Incidence de la leishmaniose tégumentaire sur la façade pacifique. *Annales de la Société belge de médecine tropicale*, 74(1), 1-12.
- Billeter, S. A., Cáceres, A. G., Gonzales-Hidalgo, J., Luna-Caypo, D., & Kosoy, M. Y. (2011). Molecular Detection of Bartonella Species in Ticks From Peru. *Journal of Medical Entomology*, 48(6), 1257-1260. <https://doi.org/10.1603/ME10240>
- 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), 1-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00713.x>
- Bravo-Barriga, D., Ruiz-Arrondo, I., Peña, R. E., Lucientes, J., & Delacour-Estrella, S. (2022). Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Spain: An updated checklist and extended distributions. *ZooKeys*, 1106, 81-99. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1106.81432>
- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*, 392(10151), 951-970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Calvopina, M., Armijos, R. X., & Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: Current status of knowledge - A review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(7), 663-672. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000700001>
- Carrasco, A. (s. f.). "Detección molecular de Bartonella bacilliformis en flebótomos (Diptera: Psychodidae) en la zona fronteriza Ecuatoriana-Peruana. Universidad San Francisco de Quito.

- Depaquit, J. (2014). Molecular systematics applied to Phlebotomine sandflies: Review and perspectives. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 744-756.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.027>
- Dostálová, A., & Volf, P. (2012). Leishmania development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, 5(1), 276. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>
- Galati, E. A. B. (2003). Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): Classification, Morphology and Terminology of Adults and Identification of American Taxa. En E. F. Rangel & J. J. Shaw (Eds.), *Brazilian Sand Flies* (pp. 9-212). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_2
- Galati, E. A. B., Fonseca, M. B., & Marassá, A. M. (1995). The subgenus Migonemyia Galati 1995 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), with description of a new species. 1995.
- Galati, E. A. B., Galvis-Ovallos, F., Lawyer, P., Léger, N., & Depaquit, J. (2017). An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Parasite*, 24, 26. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017027>
- Galati, E. A. B., & Ovallos, F. G. (2012). Description of Two New Sand Fly Species Related to Nyssomyia antunesi (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology*, 49(2), 238-252. <https://doi.org/10.1603/ME11118>
- García-Alegría, A. M., Anduro-Corona, I., Pérez-Martínez, C. J., Guadalupe Corella-Madueño, M. A., Rascón-Durán, M. L., & Astiazaran-Garcia, H. (2020). Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 1-9.
<https://doi.org/10.1155/2020/8896738>

- Goenaga-Mafud, L. C., Eyes Escalante, M., & Florez Arrieta, F. J. (2020). Primera aproximación a la fauna flebotomínea (Psychodidae: Phlebotominae) del departamento de Atlántico. *Acta Biológica Colombiana*, 25(3), 284-292.
<https://doi.org/10.15446/abc.v25n3.78771>
- Gomez, E. A., Kato, H., & Hashiguchi, Y. (2014). Man-biting sand fly species and natural infection with the *Leishmania* promastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. *Acta Tropica*, 140, 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.003>
- Guapulema, J., Cabrera, E., Chalán, J., Vega, M. J., & Sarango, K. (2024). Caso Clínico: Enfermedad de Carrión – Bartonelosis. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 8(1), Article 1. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i1.10104
- Hashiguchi, Y., Gomez, E. A. L., Cáceres, A. G., Velez, L. N., Villegas, N. V., Hashiguchi, K., Mimori, T., Uezato, H., & Kato, H. (2018). Andean cutaneous leishmaniasis (Andean-CL, uta) in Peru and Ecuador: The causative *Leishmania* parasites and clinico-epidemiological features. *Acta Tropica*, 177, 135-145.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.028>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Herrera, L., Benavides-Céspedes, I., Linero, J. D., Posada-Echeverría, D., Mendoza, J. A., Pérez-Doria, A., & Ardila, M. M. (2024). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae): Diversity of potential *Leishmania* vectors in northern Colombia. *Acta Tropica*, 257, 107273.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107273>

- Jumbo, A. N. D., & Ruiz, M. I. C. (s. f.). PERFIL DE MORBIMORTALIDAD DE LEISHMANIASIS EN UNA ZONA ANDINA DEL ECUADOR. 2023.
- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: Friends or foes? *Trends in Parasitology*, 22(9), 439-445. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.06.012>
- Kato, H., Cáceres, A. G., Gomez, E. A., Tabbabi, A., Mizushima, D., Yamamoto, D. S., & Hashiguchi, Y. (2021). Prevalence of Genetically Complex *Leishmania* Strains With Hybrid and Mito-Nuclear Discordance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 625001. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.625001>
- Kato, H., Uezato, H., Katakura, K., Calvopiña, M., Marco, J. D., Barroso, P. A., Gomez, E. A., Mimori, T., Korenaga, M., Iwata, H., Nonaka, S., & Hashiguchi, Y. (2005). DETECTION AND IDENTIFICATION OF LEISHMANIA SPECIES WITHIN NATURALLY INFECTED SAND FLIES IN THE ANDEAN AREAS OF ECUADOR BY A POLYMERASE CHAIN REACTION. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(1), 87-93. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.72.87>
- Lambkin, C. L., Sinclair, B. J., Pape, T., Courtney, G. W., Skevington, J. H., Meier, R., Yeates, D. K., Blagoderov, V., & Wiegmann, B. M. (2013). The phylogenetic relationships among infraorders and superfamilies of Diptera based on morphological evidence. *Systematic Entomology*, 38(1), 164-179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2012.00652.x>
- Maguina, C., Garcia, P. J., Gotuzzo, E., Cordero, L., & Spach, D. H. (2001). Bartonellosis (Carrión's Disease) in the Modern Era. *Clinical Infectious Diseases*, 33(6), 772-779. <https://doi.org/10.1086/322614>
- Marklewitz, M., Dutari, L. C., Paraskevopoulou, S., Page, R. A., Loaiza, J. R., & Junglen, S. (2019). Diverse novel phleboviruses in sandflies from the Panama Canal area, Central

Panama. *Journal of General Virology*, 100(6), 938-949.

<https://doi.org/10.1099/jgv.0.001260>

Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2013).

Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123-147.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>

Ministerio de Salud Publica del Ecuador. (2023). *Gaceta Epidemiológica Semana 10*.

<https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2023/03/Gaceta-VECTORES-SE-10.pdf>

Ministerio del Ambiente. (2012). *Sistema de clasificación de los ecosistemas del Ecuador Continental*.

Mouchet, J., Le Pont, F., Leon, R., Echeverria, R., & Guderian, R. H. (1994). Leishmaniose en Equateur. 5. Leishmaniose et anthropisation sur la façade pacifique. *Annales de la Société belge de médecine tropicale*, 74(1), 35-41.

Navarro-Soler, R., Martín-Torres, J., Alonso-Crespo, A., & Rial-Crestelo, D. (2025).

Bartonella spp. infection in a person with HIV and advanced immunosuppression: A case report. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*,

S0213005X25000011. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2024.12.009>

Padilla R, C., & Ventura E, G. (2003). Diseño y estandarización de una prueba de PCR para el diagnóstico de la Bartonelosis causada por Bartonella bacilliformis. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 20(1), 5-8.

Phan, T., Tesh, R. B., Guzman, H., & Delwart, E. (2020). Genomic characterization of Changuinola viruses from Panama: Evidence for multiple genome segment reassortment. *Virus Genes*, 56(4), 527-530. <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01758-0>

- Quiroga, C., Cevallos, V., Morales, D., Baldeón, M. E., Cárdenas, P., Rojas-Silva, P., & Ponce, P. (2017a). Molecular Identification of *Leishmania* spp. in Sand Flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) From Ecuador. *Journal of Medical Entomology*, 54(6), 1704-1711. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx122>
- Quiroga, C., Cevallos, V., Morales, D., Baldeón, M. E., Cárdenas, P., Rojas-Silva, P., & Ponce, P. (2017b). Molecular Identification of *Leishmania* spp. in Sand Flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) From Ecuador. *Journal of Medical Entomology*, 54(6), 1704-1711. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx122>
- Ramón Blanco, J., & Raoult, D. (2005). Enfermedades producidas por *Bartonella* spp. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(5), 313-320. <https://doi.org/10.1157/13074971>
- Rampersad, J. N., Watkins, J. D., Samlal, M. S., Deonanan, R., Ramsubeik, S., & Ammons, D. R. (2005). A nested-PCR with an Internal Amplification Control for the detection and differentiation of *Bartonella henselae* and *B. clarridgeiae*: An examination of cats in Trinidad. *BMC Infectious Diseases*, 5, 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-63>
- Ready, P. D. (2013). Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annual Review of Entomology*, 58(Volume 58, 2013), 227-250. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>
- Rodrigues, B. L. (2023). Molecular taxonomy of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) with emphasis on DNA barcoding: A review. *Acta Tropica*.
- Rogers, M. E., Chance, M. L., & Bates, P. A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124(Pt 5), 495-507. <https://doi.org/10.1017/s0031182002001439>

- Salas Navarrete, Anaconda, Enríquez, Sandra, Ángulo, Alexandra, Cruz, Marilyn, Álvarez Alvarado, Patricia, Gómez, Ana María, Ochoa, Juan, & León, Renato. (2019). *Leishmaniasis in Galapagos: Past reported cases and entomological data to address if local transmission is possible*. [Poster]. 10th International Symposium of Phlebotomine Sand flies (ISOPS), San Cristóbal, Galápagos, Ecuador.
- Sanchez Clemente, N., Ugarte-Gil, C. A., Solórzano, N., Maguiña, C., Pachas, P., Blazes, D., Bailey, R., Mabey, D., & Moore, D. (2012). Bartonella bacilliformis: A Systematic Review of the Literature to Guide the Research Agenda for Elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10), e1819.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001819>
- Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 581-592.
<https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>
- Shimabukuro, P. H. F., De Andrade, A. J., & Galati, E. A. B. (2017). Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): Genera, species, and their distribution. *ZooKeys*, 660, 67-106. <https://doi.org/10.3897/zookeys.660.10508>
- Sorg, I., Schmutz, C., Lu, Y.-Y., Fromm, K., Siewert, L. K., Bögli, A., Strack, K., Harms, A., & Dehio, C. (2020). A Bartonella Effector Acts as Signaling Hub for Intrinsic STAT3 Activation to Trigger Anti-inflammatory Responses. *Cell Host & Microbe*, 27(3), 476-485.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.01.015>
- Subsecretaría de Vigilancia, Prevención y Control de la Salud, Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ecuador. (2024). *Eventos de Enfermedades Transmitidas por Vectores en Ecuador (SE 1—SE 52, 2024)*. Subsecretaría de Vigilancia, Prevención y Control de la Salud, Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica,

Ecuador. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2025/01/Eventos-VECTORES-DNVE-SE-52.pdf>

Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017).

Leishmaniasis: A review. *F1000Research*, 6, 750.

<https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>

Young, D. G., & Duncan, M. (1994). *GUIDE TO THE IDENTIFICATION AND*

GEOGRAPHIC DISTRIBUTION OF LUTZOMYIA SAND FLIES IN MEXICO, THE WEST INDIES, CENTRAL AND SOUTH AMERICA (DIPTERA: PSYCHODIDAE).

Zapata, S., Mejía, L., Le Pont, F., León, R., Pesson, B., C, R., L, B., R, C., C, C., G, T., & J,

D. (2012). A study of a population of Nyssomyia trapidoi (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador. *Parasites & Vectors*, 5(1), 144.

<https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-144>

Zarea, A. A. K., Tempesta, M., Odigie, A. E., Mrenoshki, D., Fanelli, A., Martella, V.,

Decaro, N., & Greco, G. (2023). The Global Molecular Prevalence of Bartonella spp. in Cats and Dogs: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2023(1), 7867562. <https://doi.org/10.1155/2023/7867562>

Zorrilla, V., Vásquez, G., Espada, L., & Ramírez, P. (2017). Vectores de la leishmaniasis

tegumentaria y la Enfermedad de Carrión en el Perú: Una actualización. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 34(3), 485-496.

<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.343.2398>

ANEXO A: Ubicación geográfica de los sitios de muestreo

En este anexo se presenta el mapa de los sitios de muestreo en las localidades de Hacienda Pilar (Chimborazo) y San Juan (Cañar), con las coordenadas geográficas correspondientes. El mapa ilustra la ubicación de los puntos de muestreo utilizados en el estudio.



Figura 10. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo