

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Detección de ADN de kinetoplasto en vectores y posibles vectores de  
leishmaniasis en el Valle del Chocó de la provincia de Esmeraldas**

Proyecto de investigación

**Belén Rebeca Cortez Zambrano**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

**Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del  
título de Ingeniera en procesos Biotecnológicos**

Quito, 03 de mayo de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Detección de ADN de kinetoplasto en vectores y posibles vectores de leishmaniasis en el  
Valle del Chocó de la provincia de Esmeraldas**

**Belén Rebeca Cortez Zambrano**

Calificación:

Nombre del profesor, Título Académico

Sonia Zapata Mena, PhD

Firma del profesor

.....

Quito, 03 de mayo 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: Belén Rebeca Cortez Zambrano

Código: 00110847

Cédula de Identidad: 1723117683

Lugar y fecha: Quito, 03 de mayo de 2017

**DEDICATORIA:**

A mi familia, mi apoyo incondicional.

**AGRADECIMIENTOS:**

Agradezco a la Universidad San Francisco de Quito y al Laboratorio de Microbiología USFQ por permitirme realizar mi trabajo de investigación en sus instalaciones.

A mis profesores, especialmente a Sonia Zapata por permitirme ser su tesista.

A Elisa Bonaccorso del Centro de Investigación en Biodiversidad y Cambio Climático perteneciente a la Universidad Tecnológica Indoamérica quien realizó la colecta de los especímenes de estudio.

A Carolina Echeverría perteneciente al departamento de Inteligencia de la Salud del MSP quien estuvo a cargo del proceso de solicitud de los datos epidemiológicos.

A John Usiña MsC. Director Nacional de Estadística y Análisis de Información de Salud del MSP quien otorgó los datos epidemiológicos.

A Rubí Basantes por su instrucción inicial en los métodos de mi proyecto.

A mi familia por ser mi soporte durante todo el proceso y especialmente a mi hermana Pamela por ser mi amiga y mi calma durante la tempestad.

A mis amigos: Carlos Vintimilla, Brigitte Garzón, Juan Salazar, Diana Mollocana, Andrea Argudo, Carolina Armijos, Jorge Alvarez, María José Baquero, José Morocho, Rashell Torres y Paola Erazo por acompañarme durante toda la carrera.

## RESUMEN

El primer caso de leishmaniasis cutánea en el Ecuador fue reportado en 1920. Posteriormente, se han desarrollado múltiples estudios enfocados en taxonomía, fauna y ecología del vector así como también en transmisión, diagnóstico y prevalencia de la enfermedad. La leishmaniasis está presente 22 de las 24 provincias; la provincia de Esmeraldas es la segunda provincia con mayor incidencia de la enfermedad y se encuentra en aumento debido a factores como la apertura de nuevas vías, urbanización y deforestación de zonas antes no pobladas. Actualmente existen reportes de casos de leishmaniasis en la zona del valle del chocó en la provincia de Imbabura, aunque no existen reportes específicos de casos en la zona correspondiente a la provincia de Esmeraldas. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de ADN de kinetoplasto (ADNk) por PCR en tiempo real en 6 especies de vectores y posibles vectores de *Leishmania* en la zona del Valle del Chocó ubicada en el cantón Quinindé de la provincia de Esmeraldas. Para cumplir con dicho objetivo, se analizaron 446 especímenes colectados en las siguientes comunidades de: La Ye, La Yesita, Herrera, Santa Isabel y San Andrés. La tasa de infección con ADNk fue de 0.7% y correspondió al género *Endotrypanum*. Los resultados muestran ausencia de infección con ADN de *Leishmania*; sin embargo, el monitoreo de la presencia de ADNk en poblaciones de flebótomos en zonas endémicas es clave para entender la dinámica de transmisión del parásito y la identificación de posibles nuevos vectores de leishmaniasis.

### Palabras Clave

Leishmaniasis cutánea , Valle del Chocó, *Endotrypanum*, PCR Real-Time, ADNk

## ABSTRACT

The first case of cutaneous leishmaniasis in Ecuador was reported in 1920. Subsequently, multiple studies have been developed focusing on taxonomy, fauna and ecology of the vector as well as on transmission, diagnosis and prevalence of the disease. Leishmaniasis is present in 22 of the 24 provinces; the province of Esmeraldas is the second province with the highest incidence of the disease and is increasing due to factors such as the opening of new roads, urbanization and deforestation of previously unpopulated areas. There are currently reports of cases of leishmaniasis in the area of the Chocó Valley in the province of Imbabura, although there are no specific reports of cases in the area corresponding to the province of Esmeraldas. The objective of the present study was to determine the presence of kinetoplast DNA (kDNA) by Real-Time PCR in 6 species of vectors and possible *Leishmania* vectors in the Chocó Valley area located in the Quinindé canton of the province of Esmeraldas. To fulfill this objective, 446 specimens collected in the following communities of: La Ye, La Yesita, Herrera, Santa Isabel and San Andrés were analyzed. The rate of infection with cDNA was 0.7% and corresponded to the genus *Endotrypanum*. The results show absence of infection with *Leishmania* DNA; however, monitoring the presence of kDNA in sandfly populations in endemic areas is key to understand the transmission dynamics of the parasite and the identification of possible new leishmaniasis vectors.

### Keywords

Cutaneous Leishmaniasis, Choco Valley, *Endotrypanum*, Real-Time PCR, ADNk

## Tabla de contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>1. 1. Leishmaniasis.....</b>	<b>12</b>
<b>1. 1. 1. Leishmaniasis en el Ecuador .....</b>	<b>12</b>
<b>1. 2. Casos de leishmaniasis en Esmeraldas .....</b>	<b>14</b>
<b>1. 3. Leishmaniasis en el Valle del Chocó.....</b>	<b>15</b>
<b>1. 4. Descripción entomológica del Valle del chocó .....</b>	<b>15</b>
<b>1. 5. Métodos de detección molecular de <i>Leishmania</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>2. 1. Objetivo general .....</b>	<b>18</b>
<b>2. 2. Objetivos específicos .....</b>	<b>18</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>4. ÁREA DE ESTUDIO .....</b>	<b>21</b>
<b>5. MATERIALES.....</b>	<b>21</b>
<b>5. 1. Colección y clasificación entomológica.....</b>	<b>21</b>
<b>5. 2. Montaje de muestras.....</b>	<b>21</b>
<b>5. 3. Identificación taxonómica.....</b>	<b>22</b>
<b>5. 4. Extracción de ADN.....</b>	<b>22</b>
<b>5. 5. Amplificación del gen de la <math>\beta</math>-actina como control de calidad del ADN .....</b>	<b>22</b>
<b>5. 6. Amplificación del fragmento de 120 pb de ADNk por PCR Real Time.....</b>	<b>23</b>
<b>5. 7. Amplificación del fragmento de 120 pb de ADNk por PCR convencional .....</b>	<b>24</b>
<b>5. 8. Amplificación del gen HSP70 por PCR convencional.....</b>	<b>24</b>
<b>5. 9. Electroforesis en Gel de Agarosa .....</b>	<b>25</b>
<b>5. 10. Secuenciamiento de ADN.....</b>	<b>26</b>

5. 11. Análisis de secuencias de ADN.....	26
<b>6. MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
6. 1. Colección entomológica.....	27
6. 2. Montaje de las muestras .....	27
6. 3. Identificación taxonómica.....	28
6. 4. Extracción de ADN.....	28
6. 5. Amplificación del gen de la $\beta$ -Actina para control de calidad de ADN para PCR .....	28
6. 6. Amplificación del ADN de kinetoplasto por PCR en Tiempo Real.....	29
6. 7. Amplificación del ADN de kinetoplasto por PCR Convencional.....	30
6. 8. Amplificación de HSP 70 por PCR convencional.....	30
6. 9. Electroforesis de agarosa .....	31
6. 10. Secuenciamiento de ADN.....	31
6. 11. Análisis de secuencias.....	31
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
7. 1. Colección entomológica.....	32
7. 2. Identificación taxonómica.....	32
7. 3. Extracción de ADN y PCR de $\beta$ -actina .....	34
7. 4. Amplificación del ADN de kinetoplasto por PCR Tiempo Real.....	34
7. 5. Amplificación del ADN de kinetoplasto por PCR Convencional.....	34
7. 6. Amplificación de HSP 70 por PCR convencional.....	34
7. 7. Análisis de las secuencias de ADN. ....	35
<b>8. Discusión: .....</b>	<b>35</b>
<b>9. Conclusiones: .....</b>	<b>43</b>

<b>10. Recomendaciones:</b> .....	<b>44</b>
<b>11. Bibliografía</b> .....	<b>45</b>
<b>FIGURAS</b> .....	<b>49</b>
<b>Figura 1: Área de estudio en la provincia de Esmeraldas.</b> .....	<b>49</b>
<b>Figura 2: Especies de Flebótomos presentes en el Valle del chocó en Colombia.</b> .....	<b>50</b>
<b>Figura 3: Porcentaje representativo de las especies en el total de muestras analizadas</b> .....	<b>51</b>
<b>Figura 4: Porcentaje representativo de las especies en el total de muestras analizadas</b> <b>para la comunidad La Ye.</b> .....	<b>52</b>
<b>Figura 5: Porcentaje representativo de las especies en el total de muestras analizadas</b> <b>para la comunidad Santa Isabel.</b> .....	<b>52</b>
<b>Figura 6: Porcentaje representativo de las especies en el total de muestras analizadas</b> <b>para la comunidad Herrera.</b> .....	<b>53</b>
<b>Figura 7: Porcentaje representativo de las especies en el total de muestras analizadas</b> <b>para la comunidad la Yesita.</b> .....	<b>53</b>
<b>Figura 8: Porcentaje representativo de las especies en el total de muestras analizadas</b> <b>para la comunidad San Andrés.</b> .....	<b>54</b>
<b>Figura 9: Amplificación de ADN del gen de la <math>\beta</math>-Actina. El tamaño esperado de la</b> <b>banda es de 300 pb visualizada en un gel de agarosa 1%.</b> .....	<b>54</b>
<b>Figura 10: Curva de Melting para amplificación de ADN de kinetoplasto usando los</b> <b>primers JW11-JW12. Curva Roja (control positivo), Azul (control negativo) Verde</b> <b>(pooles analizados).</b> .....	<b>55</b>
<b>Figura 11: Amplificación de ADNk. El tamaño esperado de la banda es de 120 pb</b> <b>visualizada en un gel de agarosa 2%.</b> .....	<b>55</b>

<b>Figura 12: Amplificación de HSP 70. El tamaño esperado de la banda es de 120 pb visualizada en un gel de agarosa 1%. .....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 13: Análisis Neighbor Joining para las secuencias positivas obtenidas. ....</b>	<b>56</b>
<b>TABLAS.....</b>	<b>57</b>
<b>Tabla 1: Incidencia de leishmaniasis en Ecuador. ....</b>	<b>57</b>
<b>Tabla 2: Atenciones de morbilidad brindadas a pacientes por Zona, Provincia, Cantón, Parroquia, Distrito, Establecimiento de Salud y Causa Por Sexo, Edad y Tipo.....</b>	<b>60</b>
<b>Tabla 3: Lista de especies de <i>Lutzomyia</i> con comportamiento antropofílico por provincia de Ecuador. ....</b>	<b>95</b>
<b>Tabla 4: Datos de las trampas de luz utilizadas para la captura de los especímenes ..</b>	<b>97</b>
<b>Tabla 5: Concentración de reactivos del Master Mix de PCR para amplificación del gen de <math>\beta</math>- actina .....</b>	<b>101</b>
<b>Tabla 6: Concentración de reactivos del Master Mix de PCR para amplificación de ADNk por PCR Real Time .....</b>	<b>101</b>
<b>Tabla 7: Concentración de reactivos del Master Mix de PCR para amplificación de ADNk por PCR Convencional .....</b>	<b>102</b>
<b>Tabla 8: Concentración de reactivos del Master Mix de PCR para amplificación de HSP70 por PCR Convencional.....</b>	<b>103</b>
<b>Tabla 9: Resultados de la colección entomológica.....</b>	<b>104</b>
<b>Tabla 10: Número de individuos encontrados por cada especie en los diferentes sitios de las comunidades estudiadas.....</b>	<b>105</b>
<b>Tabla 11: Número de pools analizados en Real Time por especie .....</b>	<b>108</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1. 1. Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica causada por un parásito protozoario flagelado perteneciente al género *Leishmania*, del cual se conocen cerca de 20 especies. La transmisión del parásito se da por medio de la picadura de dípteros (hembras infectadas) pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae (Organización Mundial de la Salud, 2015).

La leishmaniasis es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo y se puede presentar en 3 diferentes formas clínicas: Cutáneo (LC), mucocutáneo (LMC) y visceral (LV) (Zapata, et al., 2012), siendo LC la forma más común (Organización Mundial de la Salud, 2015). En cuanto al vector, existen más de 800 especies y subespecies de flebótomos de los cuales más de 90 han sido implicados en la transmisión de la enfermedad. La gran diversidad de especies de flebótomos, se encuentran clasificados dentro de 5 géneros: *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya* en el nuevo mundo; mientras que *Phlebotomus* y *Sergentomyia* para el viejo continente. Los géneros que tienen importancia médica son: *Lutzomyia* y *Phlebotomus* (Cabrera, Mosquera, Santamaría, & Ferro, 2009). La transmisión de la enfermedad se asocia a: “las malas condiciones de vida y a la invasión del hábitat natural de los mosquitos portadores del parásito” (Redacción Médica, 2015).

#### 1. 1. 1. Leishmaniasis en el Ecuador

En Ecuador, el primer reporte de leishmaniasis fue realizado en 1920 (Zapata, et al., 2012). Por otro lado, los estudios enfocados a la taxonomía, fauna y ecología del vector de la enfermedad fueron realizados desde 1950 y estudios de transmisión se empezaron en 1982 para buscar vectores con infección natural del parásito (Hashiguchi, Velez, et. al., 2017).

Hasta el momento se ha encontrado la presencia de 7 especies de *Leishmania* en el país: *Leishmania (L) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major-like*, *L. (V) guyanensis*, *L. (V.)*

*panamensis*, *L. (V.) braziliensis*, y *L. (V.) naiffi* (Kato, Bone, Mimori, & Hashiguchi, 2016) y 73 especies de flebótomos, de las cuales 43 pican humanos, de estas se cree que muchas son posibles vectores debido a su comportamiento antropofílico. Las especies consideradas como vectoras de la enfermedad son *Nyssomyia trapidoi* y *Lutzomyia gomezi* (vector de *L. (V.) guyanensis/panamensis* en la costa del pacífico y la cordillera de los andes), *Helcocyrtomyia ayacuchensis* (vector de *L. (L.) mexicana* en el valle de los andes) y *Helcocyrtomyia tortura* (vector de *L. (V.) naiffi* en la amazonía). Adicionalmente *Helcocyrtomyia hartmanni*, *Bichromomyia flaviscutellata*, *Bichromomyia olmeca olmeca*, *Bichromomyia olmeca bicolor*, *Psychodopygus panamensis* y *Psychodopygus carrerai carrerai* han sido identificados como posibles vectores. (Hashiguchi, et. al., 2017).

En el Ecuador, la incidencia de leishmaniasis ha aumentado debido a factores como la apertura de nuevas vías, urbanización y deforestación de zonas antes no pobladas. Las 4 diferentes regiones tienen características heterogéneas inherentes al terreno, medio ambiente, forma y estilo de vida de sus habitantes, cada una de las cuales influyen en la transmisión y patobiología de la leishmaniasis en estos ecosistemas cambiantes (Hashiguchi, et. al., 2017). Estudios indican que la transmisión de la enfermedad se debe a la presencia de los reservorios en zonas intradomiciliarias y peridomiciliarias debido a la comprobación de la presencia del parásito tanto en perros como en ratas (Hashiguchi, et. al., 2017).

La leishmaniasis se encuentra extendida en 22 de las 24 provincias (Ecuador Universitario, 2013). La ocurrencia de casos de la enfermedad en las diferentes ecozonas se encuentra también correlacionada a factores físicos de temperatura y humedad. En la Amazonía se ha observado que la enfermedad tiene una incidencia mayor en la época lluviosa de marzo a agosto. En la zona norte de la cordillera de los andes (Puerto Quito, Pedro Vicente Maldonado y Los Bancos, provincia de Pichincha) hay una mayor incidencia igualmente en la época

lluviosa de octubre a enero y en la zona del sur de la cordillera (Paute y Azuay) se ha reportado una mayor incidencia de febrero a julio (Hashiguchi, et. al., 2017).

En el año 2015 se reportaron más de 1000 casos y en el 2016 se reportaron 3461 entre infección por primera vez y subsecuentes infecciones. Los casos reportados tienen una distribución desde el nivel del mar hasta los 2700 msnm y se presentan con mayor frecuencia en la región del pacífico (Calvopina, Armijos, & Hashiguchi, 2004). Por otro lado, no se conocen estadísticas reales debido a que los reportes corresponden a las personas que acuden a centros médicos de salud pública en busca de tratamiento, aun cuando a partir del año 2005 la leishmaniasis es una enfermedad de notificación obligatoria (Hashiguchi, et. al., 2017). Los datos de incidencia de la enfermedad desde 2001 hasta 2014, se presentan en la Tabla 1, adicionalmente los datos del año 2016 se presentan en la Tabla 2. Debido a que las personas no corren peligro de muerte al sufrir leishmaniasis cutánea, a diferencia de la leishmaniasis visceral, no buscan atención médica en las etapas tempranas de la enfermedad. Usualmente las personas recurren a medicina tradicional indígena. Además, la mayoría carece de acceso a centros de salud especializados donde se puede realizar el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad y además de transporte público. Actualmente la estrategia de control de la enfermedad se basa principalmente en el manejo de casos en lugar del manejo de vectores (Hashiguchi, et. al., 2017).

## **1. 2. Casos de leishmaniasis en Esmeraldas**

Según datos del MSP, entre 2001 y 2014, para la provincia de Esmeraldas, existe un total de 3587 casos y es la segunda provincia con mayor prevalencia de los mismos (Hashiguchi, et. al., 2017) ver Tabla 1. Las especies antropofílicas encontradas para la provincia de Esmeraldas son: *Lutzomyia gomezi*, *Pintomyia robusta*, *Helcocyrtomyia hartmanni*, *Psathyromyia shannoni*, *Nyssomyia trapidoi*, *Psychodopygus panamensis*, *Pintomyia maranonensis*, y *Migonemyia migonei* (Hashiguchi, et. al., 2017). *Nyssomyia trapidoi* es una

especie de amplia distribución en Centroamérica, y restringida en Sudamérica a Colombia y Ecuador. Existen registros de la presencia de *Nyssomyia trapidoi* en la provincia de Esmeraldas, la cual se ha encontrado tanto en invierno como en verano y que se ha observado que tiene comportamiento antropofílico (Arrivillaga, Ponce, & Cevallos, 2013). Los datos de especies antropofílicas tanto para Esmeraldas como para las demás provincias se encuentran en la Tabla 3.

### **1. 3. Leishmaniasis en el Valle del Chocó**

El valle del Chocó es una región que se encuentra aislada del resto de las tierras bajas de Suramérica gracias a una barrera natural que es la cordillera de los Andes. Esta es una de las razones para que en el sitio se encuentre una gran diversidad de plantas y animales. El Chocó es un corredor natural neotropical que se extiende desde la provincia de Darién al este de Panamá, cruzando por todo el occidente Colombiano hasta el noroeste del Ecuador y termina en el extremo norte del Perú. El chocó cruza el litoral pacífico de cuatro países y en algunos se adentra hasta valles, vertientes o incluso hasta el litoral caribe cubriendo 187.400 km<sup>2</sup> (Botero, 2010).

La zona del valle del chocó en Ecuador se caracteriza por estar poblada por comunidades indígena, aunque también por mestizos y negros (Botero, 2010). Las comunidades afroecuatorianas viven de la cacería, la agricultura y la pesca; los mestizos basan su economía en la agricultura (Botero, 2010). Esta población tiene un gran potencial de desarrollo debido a la presencia de una hidroeléctrica. La población no tiene acceso a centros de salud y por ende no existen reportes de la enfermedad hasta el momento.

### **1. 4. Descripción entomológica del Valle del chocó**

En la zona del valle del chocó en la provincia de Esmeraldas donde continua el bosque montano occidental, no existen registros de flebotomos, por otro lado, en otras zonas de la

provincia de Esmeraldas, si existen reportes, como por ejemplo en la zona oeste de la provincia en el ecosistema húmedo costero (Barreto, Burbano, & Barreto, 2009).

En Colombia, el Valle del Chocó es una de las regiones con la mayor prevalencia de leishmaniasis tegumentaria (Duque, Vélez, Morales, & Sierra, 2004). Existen registros de flebótomos para el bosque tropical húmedo del chocó ubicado al sur de Colombia, en la zona limítrofe con Ecuador. Adicionalmente en el departamento de Nariño se encontraron las siguientes especies: *Psathyromyia aragaoi*, *Psychodopygus ayrozai*, *Psathyromyia barrettoii*, *majuscula*, *Pressatia camposi*, *Pressatia dysponeta*, *Helcocyrtomyia hartmanni*, *Psychodopygus panamensis* y *Nysomyia trapidoi*. (Barreto, Burbano, & Barreto, 2009). Los datos de las especies de flebótomos encontrados en el valle del chocó en Colombia se encuentran en la Figura 2.

### **1. 5. Métodos de detección molecular de *Leishmania***

El diagnóstico basado en PCR es más sensible que los métodos tradicionales que incluyen inmunoensayos (Abbasi, et. al., 2013). Los métodos basados en ácidos nucleicos evitan la necesidad de cultivar parásitos, reemplazando esto con hibridación o amplificación (Weirather, et al., 2011). Dado las ventajas del uso de PCR ligado al secuenciamiento, se ha realizado la secuenciación de genes tales como ADN polimerasa  $\alpha$ , ARN polimerasa II, Gp63, Citocromo oxidasa II, N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa, Cisteína proteasa b, Citocromo b, SSU rDNA y 75L ARN para estudios filogenéticos. Además, la secuenciación de los ITS (Espaciador Transcrito Interno) del ADN ribosómico y de los minicírculos del ADNk se está utilizando con fines taxonómicos dentro del género *Leishmania* (Requena, Chicharro, García, Puerta, & Cañavate, 2012). También se ha realizado estudios de PCR-RLFP para HSP70 con el fin de discriminar entre especies de *Leishmania* (Requena, Chicharro, García, Puerta, & Cañavate, 2012).

Estos últimos enfoques proporcionan la ventaja de una mayor sensibilidad. Los métodos de amplificación descritos para la detección de especies individuales de *Leishmania* incluyen PCR convencional o métodos de PCR cuantitativos qPCR. También se realiza hibridación in situ para cuantificar *Leishmania spp.* en muestras de sangre o tejido (Weirather, et al., 2011).

Los primers dirigidos a *cytB*, *cytC* y *coxII* son 10 veces menos sensibles que los que se dirigen a los minicirulos de ADNk, dado que el número de secuencias target para el PCR es menor. Se han realizado filogenias que incluyen el uso de ITS-1, *coxII* y *cytB*. *Cyt C* y *cytB* tienen la misma tasa de evolución, pero *coxII* tiene una tasa de evolución mayor (Gallucci, et al., 2016).

Métodos moleculares de detección incluyen el uso de muestras de raspado, exudado, líquido aspirado con jeringa y biopsia congelada, fijada con alcohol y formalina, y muestras de tejido impregnadas con tarjeta FTA. Se han desarrollado métodos de tamizaje rápido de la infección basados en LAMP que son más sensibles que el PCR convencional ya que pueden detectar hasta 0,01 parásitos. El método FTA-LAMP es rápido, sensible y fácil de realizar y tiene un gran potencial de ser una herramienta para tamizaje rápido (Hashiguchi, et. al., 2017).

Adicionalmente se han desarrollado programas para la cuantificación de la infección del parásito (Luc, Prina, Lang, & Milon, 2002). La alternativa más rápida es PCR Real-Time cuantitativo y tiene el potencial para la enumeración del parásito en muestras médicas, ambientales o de vectores de *Leishmania*, es un método sensible y específico. Por otro lado, el uso de PCR ha sido limitado a proyectos de investigación y usos específicos debido a que tiene altos costos y requiere de instalaciones y personal especializado (Hashiguchi, et. al., 2017).

En el presente estudio, se busca determinar las tasa de infección de ADNk en vectores y posibles vectores de *Leishmania* en flebótomos colectados en la región del Valle del chocó en

Esmeraldas. Para ellos se utilizarán primers específicos para amplificar una región conservada de los minicírculos del kinetoplasto por medio de PCR en Tiempo Real.

## 2. OBJETIVOS

### 2. 1. Objetivo general

Detectar por PCR en tiempo real la presencia de ADN de kinetoplasto (ADNk) en 7 especies de flebótomos capturados en 5 comunidades del valle del chocó en la provincia de Esmeraldas.

### 2. 2. Objetivos específicos

- Separar los especímenes pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae en base a caracteres morfológicos
- Realizar el montaje en placa de las hembras sin ingesta de sangre
- Identificar a nivel de especie en base a criterios taxonómicos descritos en la clave de Galati 2011
- Extraer ADN de *Psychodopygus carrerai thula*, *Psychodopygus carrerai* , *Bichromomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia gomezi*, *Helcocyrtomyia hartmanni*, *Psychodopygus panamensis* y *Nyssomyia trapidoi*
- Detectar la presencia de ADN de kinetoplasto por PCR en tiempo real
- Detectar la presencia de ADN de *Leishmania* por PCR de punto final de la proteína de shock térmico (HSP70)
- Identificar la especie de *Leishmania* por análisis de secuencias de HSP70

### 3. JUSTIFICACIÓN

“La leishmaniasis es una de las enfermedades tropicales más desatendidas y que en el mundo hay actualmente 12 millones de personas infectadas” (Organización mundial de la salud, 2013).

“Se estima que cada año se producen 1.3 millones de nuevos casos y entre 20 000 y 30 000 defunciones” (Organización Mundial de la Salud, 2015). Se ha observado que tanto la morbilidad como la mortalidad se encuentran en aumento (Requena, Chicharro, García, Puerta, & Cañavate, 2012). La leishmaniasis es endémica en diferentes partes del nuevo mundo desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina y se ha constituido un problema de salud pública. Esta enfermedad es de difícil control debido a las diferentes formas clínicas de la misma, además de las diferentes especies de *Leishmania* (Hashiguchi, et. al., 2017). La leishmaniasis se presenta esporádicamente y principalmente en las áreas rurales (Cabrera, Mosquera, Santamaría, & Ferro, 2009).

El Ecuador es un país endémico para la enfermedad con excepción de la provincia de Tungurahua y las islas Galápagos (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Ecuador, 2012). Hasta el año 2010 se tenía registrado 8 especies (*Psychodopygus carrerai thula*, *Psychodopygus carrerai carrerai*, *Bichromomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia gomezi*, *Helcocyrtomyia hartmanni*, *Psychodopygus panamensis* y *Nyssomyia trapidoi*) como principales vectores de la enfermedad en el país. La incidencia de la enfermedad es de unos 1500 casos anuales distribuidos por la costa, amazonía y algunos valles de provincias andinas (Fernández & Almeida, 2012).

En el estudio realizado por Arrivillaga en el año 2013, se reporta por primera vez la presencia de *Nyssomyia trapidoi* (principal vector de *Leishmania panamensis*) en la provincia del Carchi, en la región del Valle del Chocó (Arrivillaga, Ponce, & Cevallos, 2013). Este estudio muestra una vulnerabilidad epidemiológica de la zona del Valle del Chocó a la leishmaniasis

(Arrivillaga, Ponce, & Cevallos, 2013). Adicionalmente, en el estudio realizado por (Barreto, Burbano, & Barreto, 2009), se reportó la presencia de especies vectoras de la enfermedad en el Valle del chocó en el departamento de Nariño. Es por esto que se necesita realizar estudios más a fondo en la zona del valle perteneciente al Ecuador.

Los cambios en los patrones de diseminación de la enfermedad caracterizados por un aumento de los casos se deben principalmente a un cambio en la forma de uso de la tierra, donde las migraciones internas y colonizaciones son factores de suma importancia, debido a que aumenta la exposición humana a los ciclos de vida del parásito (Calvopina, Armijos, & Hashiguchi, 2004). Adicionalmente, existen registros que indican la destrucción de 10.000 a 25.000 hectáreas de bosque primario en la zona (Botero, 2010).

En la leishmaniasis, como en muchas otras infecciones sistémicas, la detección del agente es de suma importancia para la confirmación de la infección en animales seropositivos y en estudios realizados con vectores y animales libres para identificar depósitos de infección (Gallucci, et al., 2016). Es importante el conocimiento de la transmisión de la enfermedad, las especies vectoras implicadas, las preferencias alimenticias de los mismos y su dinamismo de picadura, además del comportamiento durante la interacción y contacto vector-humano para el control de la enfermedad (Hashiguchi, et. al., 2017). Todo lo mencionado anteriormente muestra la importancia de identificar las especies de flebótomos presentes en este ecosistema y la identificación molecular del parásito en las mismas, que permitan entender el ciclo del parásito y los potenciales riesgos asociados a la población del sector.

La importancia de este estudio radica en establecer un registro de las especies de flebótomos presentes en la zona estableciendo así una referencia para realizar estudios en otras zonas de la provincia que no hayan sido estudiadas. Adicionalmente, la detección molecular del parásito en vectores y posibles vectores permitirá entender la dinámica de transmisión del parásito y el riesgo de adquirir la enfermedad en los pobladores de zonas aledañas, ¿que

permitan establecer planes de control efectivos de la enfermedad y prevención de su contagio con el fin de mejorar la calidad de vida de los habitantes de la zona.

#### **4. ÁREA DE ESTUDIO**

El área de estudio es la provincia de Esmeraldas, ubicada al norte en la región costa del Ecuador, en donde las muestras han sido tomadas en 5 comunidades de la provincia de Esmeraldas correspondientes a la región del Valle del Chocó: La Ye, La Yesita, Santa Isabel, Herrera y San Andrés, la ubicación en el mapa se presenta en la Figura 1. Los datos de las muestras se encuentran detallados en la Tabla 4.

#### **5. MATERIALES**

##### **5. 1. Colección y clasificación entomológica**

- Tubos falcon: Corning Centristar
- Cryogenic Vials: TrueNorth

##### **5. 2. Montaje de muestras**

- Agujas hipodérmicas NIPRO (13 x 3; 0.3mm x 13mm)
- Portaobjetos biselados: GoldLab
- Cubreobjetos circulares
- Etanol 70%
- Marc André (Hidrato de cloral 40%, y ácido acético 30%)
- Goma cloral (Hidrato de Cloral 30%, Goma Arábica 20% y Glicerina 13%)
- Palillos de madera
- Microscopio óptico (LEICA DME)

- Estéreo microscopio (LEICA EZ4)
- Microtubos 1.5 ml: ThermoScientific.

### **5. 3. Identificación taxonómica**

- Clave de Galati (Galati, 2003)
- Guía de identificación de Young y Duncan (Young & Duncan, 1994)

### **5. 4. Extracción de ADN**

- Proteinase K RNA grade: Ambion
- Chellex-100: BioRad
- Microtubos 1.5ml 500 U: ThermoScientific
- Guantes de Nitrilo: UltraCruz
- Agua destilada Estéril
- Microcentrífuga: Eppendorf
- Vortex (SMENSMAURO LAB MIXER)
- Baño María Shel LAB
- Micropistilo plástico
- Micropipetas (Labnet)

### **5. 5. Amplificación del gen de la $\beta$ -actina como control de calidad del ADN**

- 5U/*ul* GoTaq(R) Flexi DNA Polymerase, 500u Marca: Promega
- dNTP Mix, 10mM, 1000ul Promega
- Magnesium Chloride Solution, 25mM, 1.5ml Promega

- Primer F: 5'CGGAACCGCTCATTGCC3'
- Primer R 5'ACCCACACTGTGCCCATCTA 3'
- Puntas con filtro 10UL Bolsa: Axigen
- Puntas con filtro 20UL Bolsa: Axigen
- Puntas con filtro 200 UL Bolsa: Axigen
- Puntas con filtro 1000 UL Bolsa: Axigen
- Tubos para PCR 0.2ml Tapa Plana: Axigen
- Microtubos 1.5ml 500 U: ThermoScientific
- Guantes de Nitrilo: UltraCruz

#### **5. 6. Amplificación del fragmento de 120 pb de ADNk por PCR Real Time**

- SsoFast EvaGreen Supermix: Biorad
- Strips: Axygen
- PCR Strip Caps: Axygen
- Puntas con filtro 10UL Bolsa: Axigen
- Puntas con filtro 20UL Bolsa: Axigen
- Puntas con filtro 200 UL Bolsa: Axigen
- Puntas con filtro 1000 UL Bolsa: Axigen
- Tubos para PCR 0.2ml Tapa Plana: Axigen
- Microtubos 1.5ml 500 U: ThermoScientific
- Guantes de Nitrilo: UltraCruz
- Primer JW11F

- Primer JW12R
- CFX96™ Real-Time System
- Bio-Rad CFX Manager 3.1

### **5. 7. Amplificación del fragmento de 120 pb de ADNk por PCR convencional**

- Puntas con filtro 10UL Bolsa: Axigen
- Puntas con filtro 20UL Bolsa: Axigen
- Puntas con filtro 200 UL Bolsa: Axigen
- Puntas con filtro 1000 UL Bolsa: Axigen
- Tubos para PCR 0.2ml Tapa Plana: Axigen
- Microtubos 1.5ml 500 U: ThermoScientific
- Guantes de Nitrilo: UltraCruz
- Primers JW11F: 5' CCTATTTTACACCAACCCCCAGT 3'
- Primer JW12R: 5' GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA 3'
- dNTP Mix, 10mM, 1000ul Promega
- Magnesium Chloride Solution, 25mM, 1.5ml Promega
- 5U/ul GoTaq(R) Flexi DNA Polymerase, 500u Marca: Promega
- Tubos para PCR 0.2ml Tapa Plana: Axigen
- Micropipetas: Eppendorf

### **5. 8. Amplificación del gen HSP70 por PCR convencional**

- Puntas con filtro 10UL Bolsa: Axigen
- Puntas con filtro 20UL Bolsa: Axigen

- Puntas con filtro 200 UL Bolsa: Axigen
- Puntas con filtro 1000 UL Bolsa: Axigen
- Primer HSP sent: 5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3'
- Primer HSP ant. 5' CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3'
- dNTP Mix, 10mM, 1000ul Promega
- Magnesium Chloride Solution, 25mM, 1.5ml Promega
- Guantes de Nitrilo: UltraCruz
- GoTaq(R) Flexi DNA Polymerase, 500u Marca: Promega
- Tubos para PCR 0.2ml Tapa Plana: Axigen
- Microtubos 1.5ml 500 U: ThermoScientific
- Micropipetas: Eppendorf

### **5. 9. Electroforesis en Gel de Agarosa**

- 100bp DNA Ladder, 250ul: Promega
- Cámara de electroforesis
- Buffer TBE 1X:
  - 54g de TRIS Base (Promega)
  - 27.5g de ácido bórico (Acros Organics)
  - 20mL de EDTA pH8 [0.5M]
  - 5000mL agua destilada estéril
- Bromuro de Etidio (1:100)
- Balanza Analítica

- Frasco de pyrex
- Probeta 100 ml
- Ultra Pure Agarose: Invitrogen
- Bromuro de etidio (molecular SIGMA biology)
- Micropipetas (Labnet)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Balanza analítica (ADAM AQT-600)
- Microondas (Panasonic USP 4,942,516)
- Fotodocumentador: BioRad
- Software ImageLab

#### **5. 10. Secuenciamiento de ADN**

- Parafilm
- Laboratorio Functional Biosciences
- Amplicones

#### **5. 11. Análisis de secuencias de ADN**

- PreGap4
- Gap5
- MEGA5
- BLAST
- Bioedit

## **6. MÉTODOS**

### **6. 1. Colección entomológica**

La recolección de especímenes se realizó durante los meses de agosto y noviembre del 2014 por profesionales de la Universidad Tecnológica Indoamérica. Este procedimiento fue llevado a cabo utilizando la trampa de luz amarilla 2836BQX - CDC Mini Light Trap, With Photo Cell, colocada en 21 sitios diferentes ubicados dentro de 5 comunidades del Valle del chocó en Esmeraldas-Ecuador. Los datos geográficos de la ubicación de las 21 trampas de luz se encuentran detallados en la Tabla 4. Las muestras mencionadas, fueron enviadas al laboratorio de Parasitología de la Universidad San Francisco de Quito en tubos falcon con etanol al 70% y conservadas a -20 °C.

### **6. 2. Montaje de las muestras**

El montaje de 522 especímenes hembras, pertenecientes a 15 sitios de captura se realizó con la ayuda de un estereomicroscopio marca Leica EZ4. Para esto, primero se colocó al espécimen en un portaobjetos con una gota de etanol al 70% para evitar que se deshidrate. Posteriormente se separó la cabeza, las alas y los últimos 3 segmentos de la parte distal del abdomen correspondiente a la región de la espermateca. Los segmentos restantes del tórax y abdomen, fueron guardados en un microtubo de 1.5 ml a -20°C. En una placa nueva, se colocó una gota de goma cloral y se transfirió primeramente las alas. Se colocó 2- 3 gotas de solución de Marc André a la cabeza y la parte distal y se procedió a pasar el portaobjetos por la llama de un encendedor con el fin de aclarar las estructuras y de que sea más fácil su posterior observación. Después de esto, las estructuras fueron transferidas al otro portaobjetos con la goma y las alas y se colocó el cubreobjetos. Finalmente se realizó una leve presión al cubreobjetos con un palillo de madera para aclarar aún más las estructuras. Se dejó secar por aproximadamente 2 días en la estufa a 65°C.

### **6. 3. Identificación taxonómica**

La identificación a nivel de especie se llevó a cabo con ayuda de las claves taxonómicas de (Young & Duncan, 1994) y (Galati, 2003). Las estructuras que se tomaron en cuenta para la identificación fueron la forma de la espermateca, el cibarium que es un espacio anterior a la cavidad oral ubicado entre los maxilares y la base hipofaringe del insecto y el tamaño de los palpos que son las regiones sensoriales.

### **6. 4. Extracción de ADN**

La extracción de ADN, se realizó siguiendo el protocolo con Chellex-100 (Indonesian Biodiversity Research Centre, 2016). Para esto, se colocó el resto de tórax y abdomen de cada espécimen en un microtubo de 1.5 ml. Se añadió 100  $\mu$ l de Chellex-100 al 10%. Se trituró la muestra con ayuda de un pistilo y se agitó con ayuda de un vórtex por 2 min. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm (2000 g) por 15 segundos. Luego se añadió 5  $\mu$ l de proteinasa K y se incubó a 56 °C por una hora. Posteriormente se agitó por 2 min y se incubó a 95 °C por 30 minutos. Finalmente se centrifugó a 5000 rpm por 15 segundos y se transfirió el sobrenadante a un microtubo de 1,5 ml. Y se almacenó a -20°C.

### **6. 5. Amplificación del gen de la $\beta$ -Actina para control de calidad de ADN para PCR**

La reacción de amplificación fue realizada a un volumen final de 20  $\mu$ l. Para esto se realizó un mastermix con un volumen por muestra de 6.8  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O PCR, 5  $\mu$ l de Buffer, 2.5  $\mu$ l de dNTPs, 2  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 1.25  $\mu$ l de primer  $\beta$ -act, 1.25  $\mu$ l de primer  $\beta$ -actR. 0.2  $\mu$ l de Taq Polimerasa y 1  $\mu$ l de ADN. Las concentraciones de los reactivos y los volúmenes utilizados se detallan en la Tabla 5. El protocolo de amplificación consistió en una denaturación inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 34 ciclos de denaturación de 92°C por 50 segundos, annealing a 45°C por 50 segundos, extensión a 72°C por 50 segundos, seguido de extensión final a 72°C

por 2 minutos. El control positivo utilizado fue *L. (V). guyanensis* aislada de una lesión de un paciente con LC y el control negativo fue agua destilada estéril para PCR.

## 6. 6. Amplificación del ADN de kinetoplasto por PCR en Tiempo Real

Posterior a la identificación y extracción de ADN, se realizó PCR para 148 pooles correspondientes a 7 especies: *Nyssomyia trapidoi*, *Psychodopygus panamensis*, *Psychodopygus carrerai thula*, *Helcocyrtomyia hartmanni*, *Lutzomyia gomezi*, *Pintomyia serrana* y *Trichophoromyia reburra*. Los pooles fueron preparados después de la identificación entomológica de los flebótomos. Cada pool fue constituido de 3 muestras de ADN de flebótomos de la misma especie. El volumen final de la reacción fue de 10 *ul*: 1.7 *ul* de H<sub>2</sub>O PCR, 5 *ul* de SsoFast EvaGreen Supermix, 0.15 *ul* de primer JW11F y 0.15 *ul* de primer JW12R. Las concentraciones finales de los reactivos se detallan en la Tabla 6. Del master mix se toman 7 *ul* y los *ul* restantes corresponden a un conjunto de 3 muestras de ADN de la misma especie, de las cuales se coloca 1 *ul* de cada una. El protocolo del termociclador incluyó denaturación a 95°C por 8 segundos con una curva de 20°C/s, amplificación (40 ciclos) a 95°C por 10 segundos con una curva de 20°C/s; 56°C por 10 segundos con una curva de 20°C/s y a 72°C por 8 segundos con una curva de 20°C/s, melting a 95°C por 10 segundos con una curva de 20°C/s; 67°C por 30 segundos con una curva de 20°C/s y 95°C por 10 segundos con una curva de 0.1°C/s (continua). Finalmente el enfriamiento fue a 40°C por 60 segundos con una curva de 20°C/s (Luc, Prina, Lang, & Milon, 2002). El control negativo fue agua destilada estéril para PCR. El control positivo utilizado fue *L. (V). guyanensis*. Se procesó un total de 160 pooles y se consideraron positivos a los pooles con picos de temperatura de fusión que se encuentren en el rango mencionado y que tengan un  $-d(\text{RFU})/dT$  mayor a 60. En la Figura 10 se observan 2 patrones de picos sobresalientes. Usualmente se encontró picos aproximadamente a 75°C

correspondiente a amplificaciones inespecíficas y el segundo patrón con  $T_m$  esperado se encontró entre 81-84°C.

### **6. 7. Amplificación del ADN de kinetoplasto por PCR Convencional**

A todos los pools positivos a PCR en tiempo real que tenían curvas de melting con picos entre 80 y 84 °C, se realizó PCR convencional para poder determinar que muestra presente en los pools era positiva. Para esto se realizó un mastermix con un volumen por muestra de 1.6 *ul* de H<sub>2</sub>O PCR, 2 *ul* de Buffer, 2 *ul* de dNTPs, 1 *ul* de MgCl<sub>2</sub>, 0.15 *ul* de primer *JW11F*, 0.15 *ul* de primer *JW12R*, 0.1 *ul* de Taq Polimerasa y 3 *ul* de ADN. Los datos de la concentración final de reactivos por reacción se detallan en la Tabla 7. La reamplificación del ADN de kinetoplasto de 120 pb, se lleva a cabo por medio de PCR convencional con un tiempo total de 2h 19 min. El protocolo para el termociclador incluyó una denaturación inicial a 94°C por 30 segundos, seguido de 5 ciclos de denaturación de 94°C por 3 minutos, annealing a 45°C por 90 segundos, extensión a 68°C por 60 segundos, seguido de 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, annealing a 51°C por 30 segundos, seguido de extensión a 68°C por 60 segundos y la extensión final a 68°C por 10 minutos. El control positivo utilizado fue *L. (V). guyanensis*. El control negativo fue agua destilada estéril para PCR y muestras de ADN de machos.

### **6. 8. Amplificación de HSP 70 por PCR convencional**

Todas las muestras positivas para ADNk se amplificó para el gen HSP 70 por medio de PCR convencional. El volumen final de la reacción fue de 10 *ul*, conformado por: 3.55 *ul* de H<sub>2</sub>O PCR, 2 *ul* de Buffer, 1 *ul* de dNTPs, 0.6 *ul* de MgCl<sub>2</sub>, 0.4 *ul* de primer *HSP70sent*, 0.4 *ul* de primer *HSP70ant*, 0.05 *ul* de Taq Polimerasa y 2 *ul* de ADN. Las concentraciones de los reactivos para la reacción se detallan en la Tabla 8. El protocolo del termociclador incluyó denaturación inicial a 95°C por 15 minutos, seguido de ciclos de denaturación de 94°C por 30

segundos, annealing a 60°C por 60 segundos, extensión a 72°C por 60 segundos, seguido de 45 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos y la extensión final a 72°C por 6 minutos. Se utilizaron los mismos controles para el PCR en tiempo real.

### **6. 9. Electroforesis de agarosa**

Se preparó un gel de agarosa al 1% ( $\beta$ -Actina y HSP-70) o al 2% (ADNk) para lo cual se resuspendió 1 o 2 gramos de agarosa en 100 ml de buffer TBE 1X respectivamente. Se calentó por 2 min en el microondas hasta la disolución total de la agarosa se encontró derretida. Se dejó reposar la mezcla hasta que esta llegó a una temperatura resistible al tacto. Se añadió 1 *ul* de bromuro de etidio (1:100) y se colocó la mezcla en el molde para el gel. Una vez que solidificó el agar, se retiró la peineta para los pocillos y se llenó la cámara con buffer TBE 1X. En cada pocillo se colocó 5 *ul* de amplicón y 1 *ul* de ladder 100 pb en un pocillo vacío. Se corrió por 40 min a 100 mAmp y 200 V. Finalmente, se tomó la foto del gel utilizando un foto documentador. El tamaño esperado de la banda fue de 300 pb para  $\beta$ -Actina, 120 pb para JW11-12 y 1422 pb para HSP-70.

### **6. 10. Secuenciamiento de ADN**

Los productos de PCR positivos para JW11-JW12, fueron enviados a secuenciar en el sentido reverse (JW12) al laboratorio Functional BioScience, Wisconsin, USA.

### **6. 11. Análisis de secuencias**

Las secuencias fueron analizadas con los programas: MEGA 5, Bioedit, Gap5 y PreGap4.

## 7. RESULTADOS

### 7. 1. Colección entomológica

La Tabla 4 muestra los datos de los 21 tubos Falcon obtenidos durante la colecta, los cuales pertenecen a 5 comunidades: La Ye, La Yesita, Santa Isabel, Herrera y San Andrés, correspondientes al Valle del chocó en Esmeraldas, Ecuador cercanas a la Reserva Biológica Bilsa y dentro del territorio de la reserva ecológica Mache-Chindul en el cantón Quinindé.

En el presente estudio se utilizaron solamente 15 tubos representativos de cada fragmento estudiado, debido al alcance del proyecto presentados en la Tabla 9. De acuerdo con los datos de la Tabla 9, se observa que se separó un total de 273 machos y 522 hembras que corresponde a una mayor proporción de hembras (66%) que machos (34%).

La comunidad la Ye fue muestreada en 3 sitios que se caracterizan por tener altitud diferente (222, 339 y 389 msnm). En cuanto a la comunidad de Santa Isabel, se muestrearon 3 sitios igualmente, con altitud de 528, 573, 585 msnm. Para la comunidad Herrera, se analizaron 4 sitios a: 177, 223, 243 y 254 msnm. De la comunidad La Yesita se muestreó a 601 y 629 msnm. En la comunidad de San Andrés, se tomó muestras de 3 sitios correspondientes a 166, 219 y 300 msnm.

Se realizó el montaje en placa de 490 hembras pertenecientes a los 15 primeros tubos colectados. El número de individuos a los cuales se les realizó placa por cada tubo se presentan en la Tabla 10. Los sitios con mayor número de hembras fueron el tubo 1 perteneciente a la comunidad de La Ye, los tubos 13 y 14, que pertenecen a la comunidad de San Andrés.

### 7. 2. Identificación taxonómica

En los 15 sitios analizados, se encontró un total de 12 especies. Las especies identificadas en las diferentes zonas de muestreo fueron *Psychodopygus panamensis*, *Nyssomyia trapidoi*,

*Psychodopygus carrerai thula*, *Helcocyrtomyia hartmanni*, *Pintomyia serrana*, *Trichophoromyia reburra*, *Lutzomyia gomezi*, *Helcocyrtomyia sanguinaria*, *Psathyromyia aragaoi*, *Sciopemyia sordelli*, *Pintomyia ovallesi* y *Viannamyia caprina*.

*Psychodopygus panamensis* fue encontrado en todas las comunidades: La Ye (sitio 1 y 12), Santa Isabel (sitios 2, 3 y 8), Herrera (sitios 5, 9, 10, 11), La Yesita (sitio 6) y San Andrés (sitios 13 y 14). *Nyssomyia trapidoi* fue encontrado en todos los sitios de las comunidades La Ye, Santa Isabel, Herrera y San Andrés. No se encontró esta especie en La Yesita. *Helcocyrtomyia hartmanni* se encontró en la comunidad La Ye (sitio 12), Santa Isabel (sitio 8), Herrera (todos los sitios), La Yesita (sitio 7) y San Andrés (sitios 13 y 14). *Psychodopygus carrerai thula* se encontró en: La Ye (sitio 1), Santa Isabel (sitio 8), Herrera (sitios 5 y 9) y San Andrés (sitios 13 y 14). *Lutzomyia gomezi* se encontró en la comunidad Herrera (sitio 11) y San Andrés (sitio 13). *Trichophoromyia reburra* se encontró en Santa Isabel (sitio 2) y La Yesita (sitios 6 y 7). El género *Pressatia* se encontró en la comunidad La Ye (sitio 1 y 12), Herrera (todos los sitios) y San Andrés (sitio 14). *Helcocyrtomyia sanguinaria* fue encontrada en la comunidad La Ye (sitio 1 y 12). *Pintomyia serrana* fue encontrada en la comunidad La Ye (sitio 1) y en Herrera (sitio 5 y 10). *Pintomyia ovallesi* se encontró solamente en la comunidad Herrera (sitio 11). Se encontró: *Psathyromyia aragaoi*, *Sciopemyia sordelli* y *Viannamyia caprina* solamente en la comunidad de San Andrés (sitio 13). Adicionalmente la comunidad de San Andrés presentó el mayor número de individuos colectados. Los detalles del porcentaje de especies en cada comunidad, se encuentran en las Figuras 4-8.

Adicionalmente, se evidencia en la Figura 3 que las especies con mayor prevalencia dentro de las muestras de los 15 fragmentos son *Psychodopygus panamensis*, seguido por *Nyssomyia trapidoi*. Esto se puede observar también en la Figura 3 donde se hace evidente que solo las muestras correspondientes a las dos especies constituyen más del 50% de todas las muestras estudiadas.

### 7. 3. Extracción de ADN y PCR de $\beta$ -actina

Se extrajo el ADN de un total de 446 muestras, pertenecientes a las siguientes especies: *Psychodopygus carrerai thula*, *Psychodopygus carrerai carrerai*, *Bichromomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia gomezi*, *Helcocyrtomyia hartmanni*, *Psychodopygus panamensis* y *Nyssomyia trapidoi*. El género *Pressatia* no fue analizado porque no incluye especies vectoras o posible vectoras de leishmaniasis.

La amplificación del gen de la  $\beta$ - actina realizada como control de calidad de las muestras fue exitosa para las 446 muestras analizadas, lo cual se confirmó por la presencia de bandas correspondientes a 300 pb, ver Figura 9.

### 7. 4. Amplificación del ADN de kinetoplasto por PCR Tiempo Real

Se analizó un total de 148 pooles de los cuales solamente 3 fueron positivos, por lo tanto el porcentaje de pooles positivos encontrados fue del 2,03%. Los pooles positivos correspondieron a 2 especies: *Psychodopygus panamensis* y *Nyssomyia trapidoi*. Cerca del 66% estuvo representado por: *Nyssomyia trapidoi* (2) y el 33% por *Psychodopygus panamensis* (1), ver Tabla 11.

### 7. 5. Amplificación del ADN de kinetoplasto por PCR Convencional

Los 3 pooles positivos fueron abiertos por PCR convencional siendo un total de 9 muestras procesadas por dicho método. De estas, solamente 3 muestras fueron positivas, ver Tabla 11, Figura 11.

### 7. 6. Amplificación de HSP 70 por PCR convencional

Las muestras positivas para la amplificación de ADN de kinetoplasto fueron negativas para la amplificación de HSP70 ver Figura 12. Lo que indica que ninguna muestra presentó ADN de *Leishmania*.

### 7. 7. Análisis de las secuencias de ADN.

Las secuencias obtenidas correspondieron al género *Endrotrypanum* altamente relacionado con *Leishmania* ver Figura 13.

### 8. Discusión:

Esmeraldas es una provincia cuyo clima se encuentra afectado por su ubicación geográfica dado que se encuentra en la zona tórrida, al oeste de la Cordillera de los Andes y gracias a las corrientes marinas que llegan a sus costas. Existen dos climas definidos: tropical monzón con una temperatura promedio de 21°C en la región al pie de la cordillera de los andes y tropical húmedo en las cuencas centrales y costa externa septentrional cuya temperatura promedio es de 25°C desde la boca del río Santiago hacia el sur, con una oscilación entre 8 y 28 °C. Para el año 2013, la variación porcentual de la precipitación acumulada fue de un -3% entre 831,6 mm a 807,2 mm, adicionalmente el número total de días de precipitación fue de 158 (GADPE, 2015). La provincia de Esmeraldas es también caracterizada como húmeda debido a que la pluviosidad oscila entre los 500 mm – 700 mm anuales en época seca y varía en la época lluviosa entre los 2000 mm a 7000 mm anuales. El nivel de precipitación se mantiene a lo largo de todo el año con una marcada estación seca entre los meses de Julio y Noviembre específicamente (GADPE, 2015). Adicionalmente, se debe mencionar que en la zona de estudio perteneciente al cantón Quinindé, el mes más seco es agosto y el mes con mayor precipitación es marzo.

En América Latina, la leishmaniasis cutánea ha sido asociada con ecosistemas de bosque, con alta precipitación, alta temperatura, climas húmedos y alta presión de vapor, haciendo que esta enfermedad sea relacionada con enfermedades ocupacionales de trabajadores de bosque. Por otro lado, existe una gran incidencia de transmisión domiciliaria y peridomiciliaria. Esta adaptación de los vectores da lugar a que exista una mayor probabilidad de transmisión de la enfermedad y también hace que el control de la misma sea más fácil. Los insectos vectores

tienen preferencias por los climas cálidos con una mayor prevalencia en la época monzónica o lluviosa (Peterson & Shaw, 2003) y en la época con mayor humedad relativa (Molina, Ortiz, & Guhl, 2008). La colecta de los individuos fue realizada durante la estación seca de la región por lo que ésta es una de las razones para que no hayamos tenido un mayor número de individuos en las capturas que dieran lugar a un mayor tamaño de muestra y por ende positivos para infección de *Leishmania*.

Dentro de las especies documentadas en la zona de estudio, se conoce que: *Psathyromyia aragaoi*, *Helcocyrtomyia hartmanni*, *Psychodopigus panamensis* y *Nyssomyia trapidoi*, han sido descritas presentes en la zona del valle del chocó perteneciente al departamento de Nariño en Colombia, que es limítrofe con la provincia de Esmeraldas (Barreto, Burbano, & Barreto, 2009). En el presente estudio, se reporta a *Nyssomyia trapidoi* como la segunda especie prevalente en la zona, lo que representaría un riesgo para las comunidades aledañas debido a que esta especie es considerada como el vector principal de *L. (V.) panamensis* (Arrivillaga, Ponce, & Cevallos, 2013). Adicionalmente, *Helcocyrtomyia hartmanni*, *Lutzomyia gomezi* son consideradas especies vectoras y también fueron encontradas en las comunidades muestreadas (Zapata, et al., 2012). Dentro de las especies de flebótomos identificadas como posibles vectores se encontró *Pintomyia serrana* que ha sido reportada como vector de *L. (V.) brazilensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis* en la Amazonía (Calvopina, Armijos, & Hashiguchi, 2004). Por dichas razones, no se descarta la posibilidad de encontrar flebótomos de dicha especie infectados con el parásito en estudios posteriores en la misma zona.

En estudios realizados en Panamá, *Nyssomyia trapidoi*, *Lutzomyia gomezi* y *Psychodopigus panamensis* han sido encontrados en zonas endémicas de leishmaniasis que incluyen bosques con fragmentación y ecosistema alterado (Valderrama, Tavares, & Andrade, 2011). *Lutzomyia gomezi* se encuentra principalmente en zonas que han sido intervenidas en gran manera y es

difícil encontrarlo en bosques primarios. Este patrón de distribución es lo opuesto al de *Helcocyrtomyia hartmanni*. Esto se comprobó en el estudio dado que solamente se encontraron 3 individuos de *Lutzomyia gomezi* comparados con los 28 individuos de *Helcocyrtomyia hartmanni*. En regiones de cultivos y en bosques existe una mayor prevalencia de *Helcocyrtomyia hartmanni* y *Nyssomyia trapidoi*. Por otro lado, *Nyssomyia trapidoi* ha sido determinada como una especie con capacidad de adaptarse a deforestación y tiene la misma incidencia de ocurrencia en bosques como en zonas intervenidas (Duque, Vélez, Morales, & Sierra, 2004) (Zapata, et al., 2012). Por estas razones, se concluye que la presencia de especies vectoras en el sector puede dar lugar a transmisión activa del parásito y por lo tanto se requieren más estudios que incluyan un mayor número de especímenes analizados.

La Ye es una comunidad por donde pasan ciudadanos de otras comunidades que incluyen: La Yesita, Santa Isabel, Dógola, Aguacatal, La “Y” de mono, Quinindé y sobretodo personas extranjeras que van a visitar a la laguna que se encuentra en la cercanía (La Hora, s/f). La presencia de *Nyssomyia trapidoi* como la especie con mayor número de individuos capturados nos permite inferir a cerca del estado del ecosistema en la comunidad. Asimismo, la comunidad de Herrera, se encuentra ubicada en el cantón Quinindé de la provincia, a 20 minutos en auto de la Ye. Esta zona tiene alto movimiento comercial, turístico ya que posee acceso a transporte y es considerada como el punto de encuentro (La Hora, s/f). Los niños en edad escolar deben ir a esta comunidad para continuar con sus estudios debido a que en la Ye solo existe educación hasta los 7 años. La abundancia de *Pressatia* en la zona corrobora las características de la comunidad debido a que las especies de este género han sido asociadas con actividades de crianza de cerdos y gallineros (Vela, 2014). Los patrones de frecuencia con las especies coinciden con el hecho de que las comunidades estudiadas se encuentran intervenidas ampliamente por el ser humano y ya no se encuentra amplias áreas de bosque

primario (La Hora, s/f). Esto también demuestra las dificultades que se tiene para realizar la identificación de especies de *Leishmania*, dado que los flebótomos se encuentran en regiones dinámicas que se sobreponen y los parásitos tienen diferente susceptibilidad al tratamiento (Weirather, et al., 2011).

De acuerdo con los datos del Ministerio de Salud pública, para el año 2015, del total de casos de Leishmaniasis reportados para la provincia de Esmeraldas (334), 52 corresponden al Cantón Quinindé. Adicionalmente se debe mencionar que 8 de estos fueron documentados en la comunidad de La Ye distribuidos igualitariamente entre hombres y mujeres. El diagnóstico específico de los casos fue Leishmaniasis cutánea (7) y no especificada (1). La incidencia de casos se encuentra en un rango de edades de 3 a 22 años y se observa que los hombres presentan reincidencia de la enfermedad (MSP, 2015). El reporte de casos en el cantón se extiende a lugares como Viche, San Roque, Simón Bolívar la Sexta, Unión de Quinindé, Cube y Chucaple. Dado que en el presente estudio no se encontró flebótomos infectados con ADN de *Leishmania*, se debería realizar mas estudios en la cercanía a los lugares del cantón donde se encuentra incidencia de la enfermedad. Por otro lado, el número de casos reportados puede subestimar el número real debido a que la mayoría de personas no acuden a centros de salud con el fin de obtener atención médica dado que la leishmaniasis es una enfermedad que produce daño limitado y superficial y existe una tendencia de los pacientes a no buscar tratamiento ya que muchas lesiones se curan espontáneamente (Nakkash, Makki, Nahhas, Knio, & Nuwayri, 2011).

La comunidad La Ye es la única que presenta casos documentados y por ende debería ser la única donde deberíamos tener resultados positivos. Por otro lado, los positivos correspondieron a las comunidades de La Ye, La Yesita y Santa Isabel. La diferencia de sensibilidad entre PCR en tiempo real y PCR convencional se comprueba con la amplificación de 26 positivos por el primer método y solo 3 por el segundo. PCR

convencional tiene baja sensibilidad y puede generar un gran número de falsos negativos (Gallucci, et al., 2016). Por otro lado, se conoce que la sensibilidad del PCR para detección de ADNk es del 98,7% (Mugasa, et al., 2010).

En el presente estudio no se encontró infecciones de flebótomos con *Leishmania* pero sí con *Endotrypanum*. Algunas posibles razones para este fenómeno radican en que la tasa de infección de *Leishmania* es generalmente baja (Kato, Bone, Mimori, & Hashiguchi, 2016). Se han determinado tasas de infección de 1.09 % en flebótomos (Gómez, Kato, & Hashiguchi, 2014) y considerando el pequeño tamaño de muestra esto reduciría aun más la tasa de infección. Se debe mencionar también que Ecuador no es considerado como uno de los países con la mayor incidencia de leishmaniasis, comparado con Colombia que es un país fronterizo, el cual se encuentra en la lista de los 10 países del mundo con mayor número de casos reportados (Alvar, et. al., 2012). Por lo tanto, los resultados negativos obtenidos coinciden con otros estudios realizados.

En Ecuador se ha reportado la presencia de *Endotrypanum monterogeei* y *Endotrypanum schaudini* son parásitos de perezosos (Brazil, Fuzzari, Andrade, 2015) (Paiva, et. al., 2006). También existen estudios donde se ha observado frecuentemente la infección natural con promastigotes de *Endotrypanum* en *Nyssomyia trapidoi* y *Helcoctomyia hartmanni* en diferentes áreas de 11 provincias del Ecuador dentro de las cuales no está incluida Esmeraldas (Hashiguchi, et. al., 2017). Existen reportes acerca del porcentaje de infección de *Endotrypanum* en *Nyssomyia trapidoi* correspondientes al 11.5% (Zapata, et al., 2012) y en *Nyssomyia yuilli yuilli* del 3.9% (Kato, Bone, Mimori, & Hashiguchi, 2016). En el presente estudio se encuentra una menor tasa de infección de *Endotrypanum* con respecto a lo esperado según estudios previos en *Nyssomyia trapidoi* donde el porcentaje de infección de las hembras fue del 12,2% (Vela, 2014).

El parásito, *Endotrypanum*, es también llamado el parásito de la “sangre de la pereza” en las Américas. Las infecciones naturales de los flebótomos pueden conducir a menudo a diagnóstico erróneo de *Leishmania* (Hashiguchi, et. al., 2017). Tanto *Endotrypanum* como *Leishmania* pertenecen a la familia Trypanosomatidae y pueden ser confundidos debido a que son los géneros más emparentados y su distribución puede solaparse (Kato, et. al., 2013). Se ha determinado que el porcentaje de diferencia en las secuencias correspondientes a los 2 parásitos en el caso de cyt b es del 10% y al realizar análisis filogenético, la divergencia es del 0,05%, por lo que esto aumenta la posibilidad de error en la discriminación de los mismos (Kato, et. al. 2016). Un ejemplo de ello es la reclasificación de *L(V). equatorensis* dentro del género *Endotrypanum* debido a su mayor cercanía con este género que con *Leishmania* (Kato, et. al., 2013). La amplificación de ADNk por PCR en Tiempo Real sirvió como un tamizaje inicial debido a que permite realizar pooles de 3 individuos y así disminuir costos y la carga de trabajo. Por otro lado, en el presente estudio se utilizó HSP70 como un segundo marcador para confirmar la presencia de *Leishmania* debido a que también se amplifica *Endotrypanum* con los primers inicialmente usados (Abbasi, et. al., 2013). El uso de marcadores moleculares permite evitar errores y discriminar entre géneros, es por esto que en el presente estudio se utiliza HSP-70 para confirmar, por otro lado, debido a que no se amplificó para ninguna muestra positiva para ADNk, y no haber homología de las secuencias con ninguna del gene bank al no haber secuencias de ADNk para este parásito, se concluye que los parásitos encontrados fueron *Endotrypanum*.

Se ha observado que existe la infección de *Endotrypanum* o *Leishmania* en algunas especies de *Lutzomyia* y que también se puede producir coinfección debido a que se cree que la morfología y el comportamiento de los 2 en el intestino del flebótomo y su distribución es similar (Barbosa, et. al., 2006). Adicionalmente, la identificación de los 2 parásitos puede ser confundida. Dependiendo de la especie de *Endotrypanum*, esta se puede encontrar con mayor

frecuencia en el píloro del insecto o puede ser detectado después de 12 días posterior a la infección por alimentación. Se pueden encontrar formas unidas en el píloro, el íleon y la ampolla rectal, con mayor intensidad y frecuencia en los dos primeros sitios. En el intestino medio, casi siempre se observaban flagelados libres y no infectan los túbulos de Malpighi. Por otro lado, *Leishmania* provoca una infección inicial en el intestino medio abdominal, seguida por escape de los flagelados a la estación posterior con la unión al píloro en grandes cantidades y en menor grado en el íleon y la ampolla rectal (Barbosa, Oliveira, Bertho, Franco, & Rangel, 2006). La transmisión de los dos parásitos puede ser realizada por algunas especies del género *Lutzomyia* por otro lado, el reservorio de *Endotrypanum* está restringido a los osos perezosos y *Leishmania* tiene la capacidad de infectar a una mayor cantidad de mamíferos dentro de los cuales se incluye al ser humano (Cupolillo, et. al., 2000).

Las diferencias en la sensibilidad del PCR puede deberse a los métodos de extracción, purificación y concentración del ADN (Gallucci, et al., 2016). La extracción de ADN utilizando Chelex-100 es considerada un método fiable para la obtención de ADN con calidad de PCR. Esto se evidencia con la amplificación de  $\beta$ -Actina de todas las muestras procesadas. Adicionalmente la calidad del ADN con respecto a compuestos fenólicos es mejor debido a que no se utilizan solventes orgánicos y evita la contaminación de las muestras al no necesitar múltiples pasos de cambio de microtubo y lavados desalinizantes. La eficiencia del proceso es mayor que utilizando métodos con fenol-cloroformo y se ha demostrado que utilizando este método existe una menor posibilidad de encontrar inhibidores en el PCR. Este método tiene un gran rendimiento con respecto a muestras que tienen una cantidad de ADN bajo el óptimo para analizar por PCR, como en el caso de los flebótomos que son de pequeño tamaño. Por lo tanto se incrementa la señal de amplificación por PCR a partir de muestras de ADN liberadas de pequeñas porciones de tejido (Walsh, Metzger, & Higuchi, 1991).

Adicionalmente, se ha observado que el rendimiento del PCR se encuentra relacionado con la concentración de ADN en tejidos que debe estar por encima de un umbral (Luc, Prina, Lang, & Milon, 2002). A concentraciones bajas del parásito menores a 10 promastigotes/ml, el método no es robusto y solamente el 59.3% de las muestras con dichas concentraciones son detectadas como positivas (Abbasi, et. al., 2013). Adicionalmente el 8% de muestras inicialmente negativas al ser evaluadas por segunda vez muestran ser leves positivos.

La concentración de ADN en los 50 *ul* finales pudo haber variado debido al tamaño de muestra utilizado, dado factores como el corte de un segmento adicional o un segmento menos en la disección y el tamaño del insecto que es ligeramente variable. Debido al pequeño volumen final obtenido, no se pudo realizar estandarización del ADN para tener una concentración estándar por medio de dilución.

Los primers JW11-JW12 han sido diseñados para detectar *L. (L.) donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis*, y *L. mexicana* por PCR convencional. Por otro lado, sabemos que en el país existen otras especies: *L. guyanensis*, *L. brasiliensis*, *L. naiffi* y *L. lainsoni*, de las cuales solo ha sido comprobada la amplificación de *L. mexicana* y adicionalmente se conoce que en esta especie la amplificación es 100 veces menos sensible (Luc, Prina, Lang, & Milon, 2002). Sin embargo, estos primers han sido comprobados para amplificación de las otras especies de *Leishmania* presentes en el Ecuador (Zapata, et al., 2012). Adicionalmente, el hecho de que los primers amplifican también para *Endotrypanum*, que es el taxón hermano, esto nos dice que si se amplifican todas las especies de *Leishmania*.

La sensibilidad muy alta para PCR en Tiempo Real (menos de 0,1 parásitos por reacción) es parcialmente incrementada debido al alto número de copias del minicírculo objetivo ADNk, que está presente en una tasa de aproximadamente 10.000 copias por parásito (Luc, Prina, Lang, & Milon, 2002). Adicionalmente la eficiencia del PCR es mayor cuando el tamaño de producto amplificado es menor y en el caso de los productos de amplificación de minicírculos

de ADNk (120 pb), estos son menores a los genes nucleares y genes de maxicírculos de ADNk (Gallucci, et al., 2016). La sensibilidad de la amplificación de los minicírculos de ADNk de *Leishmania* se ha observado con una tasa de amplificación de 24/29 muestras seropositivas (Gallucci, et al., 2016).

Adicionalmente, se ha observado que el rendimiento del PCR se encuentra relacionado con la concentración de ADN en tejidos que debe estar por encima de un umbral (Luc, Prina, Lang, & Milon, 2002). A concentraciones bajas del parásito menores a 10 promastigotes/ml, el método no es robusto y solamente el 59.3% de las muestras con dichas concentraciones son detectadas como positivas (Abbasi, et. al., 2013). Adicionalmente el 8% de muestras inicialmente negativas al ser evaluadas por segunda vez muestran ser leves positivos.

## **9. Conclusiones:**

La presencia de especies vectoras y posibles vectoras en las comunidades evaluadas abre la posibilidad de encontrar especies parasitadas por *Leishmania* en estudios posteriores con un mayor tamaño inicial de muestra. Por lo tanto, se debe continuar con estudios anuales debido a que *Leishmania* es un parásito cíclico y empezar con programas de control vectorial que eviten la transmisión de la enfermedad. La tasa nula de infección puede deberse al muestreo realizado en zonas que no reportan la incidencia de casos y al tamaño de muestra. Por esta razón se deben hacer más estudios a una mayor profundidad. La baja tasa de infección de *Endotrypanum* y la tasa nula de infección de *Leishmania* nos llevan a hacer preguntas sobre la importancia de realizar estudios adicionales acerca de la interacción entre estos tripanosomatidos y los flebótomos, especialmente utilizando un marcador para la selección dentro del intestino del flebótomo y métodos moleculares para identificar los aislamientos con sensibilidad y especificidad. Por otro lado, en el presente estudio queda pendiente el uso de otro marcador molecular para determinar la especie de *Endotrypanum* encontrada en los

flebótomos. La técnica utilizada permite tener una alta sensibilidad en los ensayos, por lo que se puede tener seguridad de la veracidad de los resultados.

El uso de herramientas moleculares para determinar la tasa de infección con ADN de *Leishmania* en flebótomos colectados en zonas endémicas de leishmaniasis permitirá entender la dinámica de transmisión del parásito y la detección de posibles nuevos vectores de la enfermedad.

#### **10. Recomendaciones:**

Para próximos estudios, se recomienda el uso de un mayor número de muestras de flebótomos en la época húmeda de la región y en zonas del cantón Quinidé (Rosa Zárate, Viche, La Unión y Cube) y de la provincia de Esmeraldas en general que presenten reportes de la enfermedad.

## 11. Bibliografía

- Organización Mundial de la Salud. (02 de 2015). *Organización Mundial de la Salud*. Retrieved 28 de 10 de 2015 from Leishmaniasis Nota descriptiva:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- Cabrera, O., Mosquera, L., Santamaría, E., & Ferro, C. (2009). Flebótomos (Diptera: Psychodidae) del departamento de Guaviare, Colombia, con nuevos registros para el país. *Biomédica* (29), 73-86.
- Pérez, A., Hernández, E., & Bejarano, E. (2008). Lutzomyia (Diptera: Psychodidae) de la Reserva Serranía de Coraza y Montes de María, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 34 (1).
- Organización mundial de la salud. (2013). *Control de la leishmaniasis*. Retrieved 25 de 10 de 2015 from La 60a Asamblea Mundial de la Salud Resoluciones y decisiones:  
[http://www.who.int/neglected\\_diseases/mediacentre/WHA\\_60.13\\_Esp.pdf](http://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_60.13_Esp.pdf)
- Bejarano, E., Rojas, W., Uribe, S., & Vélez, I. (2003). Sistemática de especies de Lutzomyia del grupo verrucarum Theodor, 1965 (Diptera: Psychodidae). *Biomédica*, 23, 87-102.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Ecuador. (2012). *Estrategias Salud Colectiva Ecuador*. Retrieved 28 de 10 de 2015 from Leishmaniasis Ecuador:  
<http://www2.panaftosa.org.br/static/repleish/textos/POSTER%20%20leishmaniasis%20ECUADOR.pdf>
- Calvopiña, M. (2010). Leishmaniasis en Ecuador. *Fac Cien Med*, 35 (1), 6-7.
- Fernandez, T., & Almeida, R. (2012). Reporte de lesiones mucosas en leishmaniosis tegumentaria americana en el litoral (costa) ecuatoriano. *Revista de patología tropical*, 4 (3), 356-366.
- Luc, N., Prina, E., Lang, T., & Milon, G. (2002). Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (5), 1666-1669.
- Redacción Médica. (03 de 12 de 2015). *Redacción Médica Ec*. Retrieved 17 de 06 de 2016 from La leishmaniasis, una enfermedad olvidada en Ecuador:  
<http://www.redaccionmedica.ec/noticia/la-leishmaniasis-una-enfermedad-olvidada-en-ecuador--86824>
- Ecuador Universitario. (04 de 09 de 2013). *Ecuador Universitario. com*. Retrieved 27 de 06 de 2016 from La leishmaniasis está presente en 22 de las 24 provincias del Ecuador:  
[http://ecuadoruniversitario.com/noticias\\_destacadas/la-leishmaniasis-esta-presente-en-22-de-las-24-provincias-del-ecuador/](http://ecuadoruniversitario.com/noticias_destacadas/la-leishmaniasis-esta-presente-en-22-de-las-24-provincias-del-ecuador/)
- Calvopina, M., Armijos, R., & Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99 (7).
- Arrivillaga, J., Ponce, P., & Cevallos, V. (2013). Primer registro de flebotominos para la provincia del Carchi en el Ecuador, Lutzomyia trapidoi (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 13 (2), 198-201.

- Botero, C. (26 de 02 de 2010). *El Choco Biogeográfico, un tesoro de la naturaleza*. Retrieved 27 de 06 de 2016 from Eco portal.net: [http://www.ecoport.net/Temas-Especiales/Biodiversidad/el\\_choco\\_biogeografico\\_un\\_tesoro\\_de\\_la\\_naturaleza](http://www.ecoport.net/Temas-Especiales/Biodiversidad/el_choco_biogeografico_un_tesoro_de_la_naturaleza)
- Ommen, G., & Clos, J. (2009). Heat Shock Proteins in Protozoan Parasites – *Leishmania spp.* (Vol. 4). Springer.
- Ranasinghe, S., & et.al. (2015). Polymerase chain reaction detection of *Leishmania* DNA in skin biopsy samples in Sri Lanka where the causative agent of cutaneous leishmaniasis is *Leishmania donovani*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110 (8), 1017–1023.
- Young, D., & 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)*. Memairs Amer.
- Galati, A. (2003). *Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da America. (Vol. Flebotomíneos do Brasil)*. Rio de Janeiro, Brasil: Fiocruz.
- Barreto, M., Burbano, M., & Barreto, P. (2009). Registros de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en nuevas localidades de Colombia. *Colombia Médica*, 37.
- Zapata, S., Mejía, L., Le Pont, F., Leon, R., Pesson, B., Ravel, C., et al. (2012). A study of a population of *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador. *Parasites and Vectors*, 5 (144).
- Valderrama, A., Tavares, M., & Andrade, J. (2011). Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106 (8).
- Duque, P., Vélez, I., Morales, M., & Sierra, D. (2004). Sand Flies Fauna Involved in the Transmission of Cutaneous Leishmaniasis in Afro-Colombian and Amerindian Communities of Choco, Pacific Coast of Colombia. *Neotropical Entomology*, 33 (2), 255-264.
- Gallucci, E., Geraldo, C., Marcili, A., Duarte, R., Borges, L., Ferreira, T., et al. (2016). Performance of Conventional PCRs Based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania spp.* *Inst. Med. Trop*, 58 (41).
- Requena, J., Chicharro, C., García, L., Puerta, C., & Cañavate, C. (2012). Sequence analysis of the 3'-untranslated region of HSP70 (type I) genes in the genus *Leishmania*: its usefulness as a molecular marker for species identification. *Parasites and Vectors*, 5 (87).
- La Hora. (s/f). *La Hora*. Retrieved 24 de 02 de 2017 from Regionales : <http://lahora.com.ec/index.php/movil/noticia/1101529558>
- Walsh, S., Metzger, D., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques*, 10 (4), 506-513.
- Weirather, J., Jeronimo, S., Gautam, S., Sundar, S., Kang, M., Kurtz, M., et al. (2011). Serial Quantitative PCR Assay for Detection, Species Discrimination, and Quantification of *Leishmania spp.* in Human Samples. *Journal of clinical Microbiology*, 49 (11), 3892–3904.

- Indonesian Biodiversity Research Centre. (2016). *Indonesian Biodiversity Research Centre*. Retrieved 17 de 03 de 2017 from Extraction Protocol: Chelex : <http://ibrc-bali.org/wp-content/uploads/2016/08/Protocol2.pdf>
- INAMHI. (2016). *Comunicados* . Retrieved 23 de 03 de 2017 from Análisis Sinóptico en las provincias de Esmeraldas, Santo Domingo de los Tsáchilas y Los Ríos sobre condiciones meteorológicas.: <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/analisis-sinoptico-en-las-provincias-de-esmeraldas-santo-domingo-de-los-tsachilas-y-los-rios-sobre-condiciones-meteorologicas/>
- GADPE. (2015). *Sistema Nacional de Información*. Retrieved 12 de 04 de 2017 from Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la provincia de Esmeraldas: [http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL\\_SNI/data\\_sigad\\_plus/sigadplusdocumentofinal/0860000160001\\_PDO T%20ACTUALIZACIÓN%202015\\_18-08-2015\\_12-32-18.pdf](http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/0860000160001_PDO T%20ACTUALIZACIÓN%202015_18-08-2015_12-32-18.pdf)
- MSP. (2015). *Atenciones de morbilidad brindadas a pacientes por Zona, Provincia, Cantón, Parroquia, Distrito, Establecimiento de Salud y Causa Por Sexo, Edad y Tipo*. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA 2015, DIRECCIÓN NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y ANÁLISIS DE INFORMACIÓN DE SALUD . Quito: MSP.
- Nakkash, H., Makki, R., Nahhas, G., Knio, K., & Nuwayri, N. (2011). Detection of *Leishmania* parasites in the blood of patients with isolated cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Infectious Diseases* (15), 491-494.
- Delgado, J. (12 de 05 de 2016). Detección y caracterización molecular de *Leishmania* en lesiones cutáneas de pobladores del Cantón Pedro Vicente Maldonado.
- Mugasa, C., Laurent, T., Schoone, G., Basiye, F., Saad, A., El Safi, S., et al. (2010). Simplified molecular detection of *Leishmania* parasites in various clinical samples from patients with leishmaniasis. *Parasites and Vectors* , 2 (13).
- Peterson, T., & Shaw, J. (2003). *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *International Journal for Parasitology* , 30, 919–931.
- Barbosa, A., Oliveira, S., Bertho, Á., Franco, A., & Rangel, E. (2006). Single and concomitant experimental infections by *Endotrypanum* spp. and *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the Neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* , 10 (8).
- Molina, J., Ortiz, M., & Guhl, F. (2008). Seasonality of *Lutzomyia fairtigi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), a species endemic to Eastern Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* , 103 (5).
- Kato, H., Bone, A., Mimori, T., & Hashiguchi, K. (18 de 05 de 2016). First Human Cases of *Leishmania (Viannia) lainsoni* Infection and a Search for the Vector Sand Flies in Ecuador. *PLOS* .

- Vela, M. (2014). Variación genética de *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) en tres zonas endémicas de leishmaniasis cutánea en el Ecuador.
- Hashiguchi, Y., Velez, L., Villegas, N., Tatsuyuki, M., Gomez, E., & Hiroto, K. (2017). Leishmaniasis in Ecuador: Comprehensive review and current status. *Acta tropica* (166), 299–315.
- Gómez, E., Kato, H., & Hashiguchi, Y. (2014). Man-biting sand fly species and natural infection with the *Leishmania* promastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. *Acta trópica*, 140 (41), 9.
- Brazil, R., Fuzzari, A., & Andrade, J. (2015). Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. *Entomol Ornithol Herpetol*, 4 (144).
- Paiva, B., & Et. al. (2006). Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Tropica*, 99, 252–259.
- Kato, & et. al. (2013). First human cases of *Leishmania (Viannia) naiffi* infection in Ecuador and identification of its suspected vector species. *Acta Tropica*, 128 (3), 710-713.
- Cupolillo, E., & et. al. (2000). A Revised Classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *ParaSite*, 16 (4).
- Abbasi, I., & et. al. (2013). Evaluation of PCR procedures for detecting and quantifying *Leishmania donovani* DNA in large numbers of dried human blood samples from a visceral leishmaniasis focus in Northern Ethiopia. *BioMed Central*, 13 (153), 1471-2334.
- Alvar, J., & et. al. (31 de 05 de 2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLOS*.

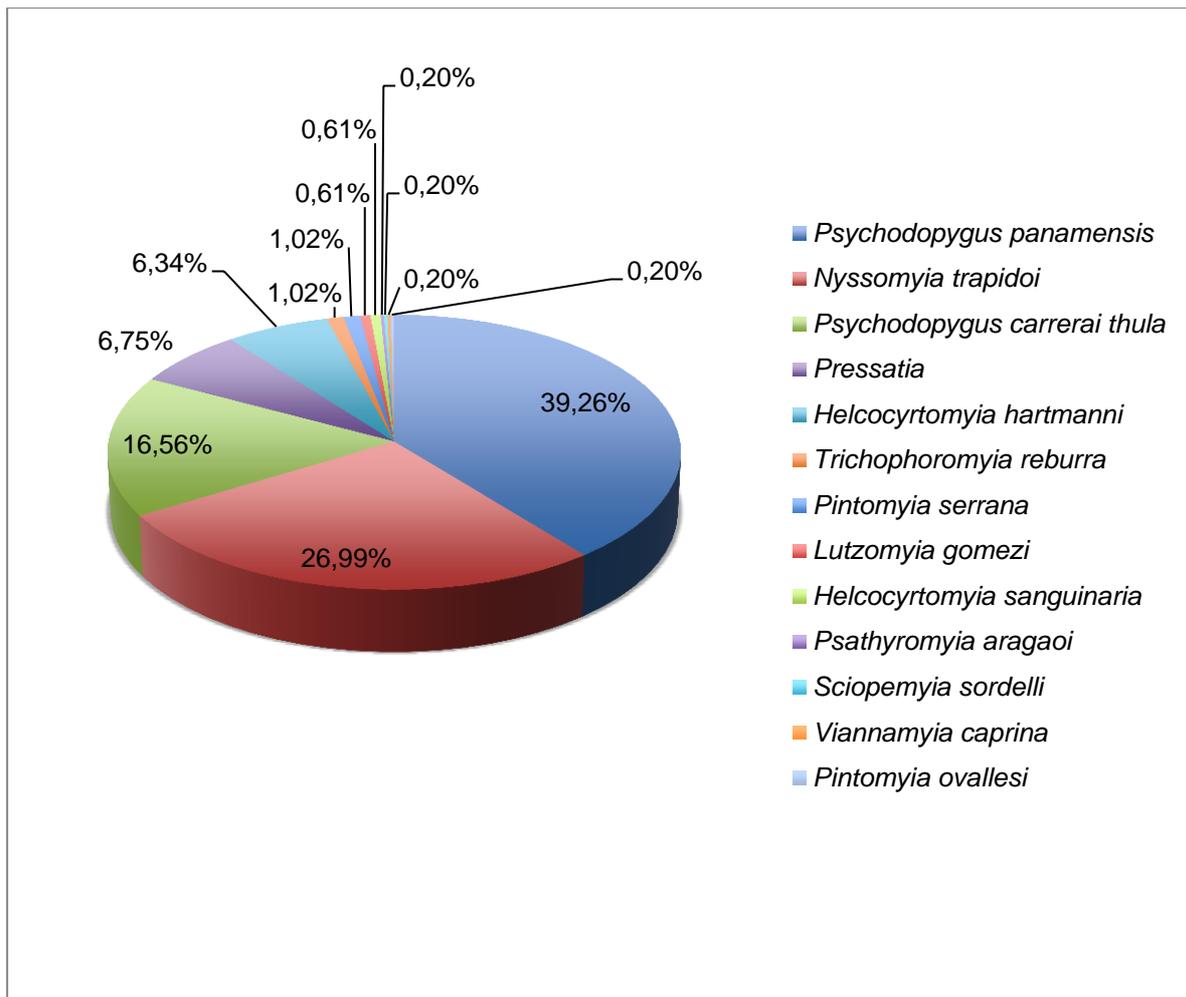
**FIGURAS**

**Figura 1: Área de estudio en la provincia de Esmeraldas.**

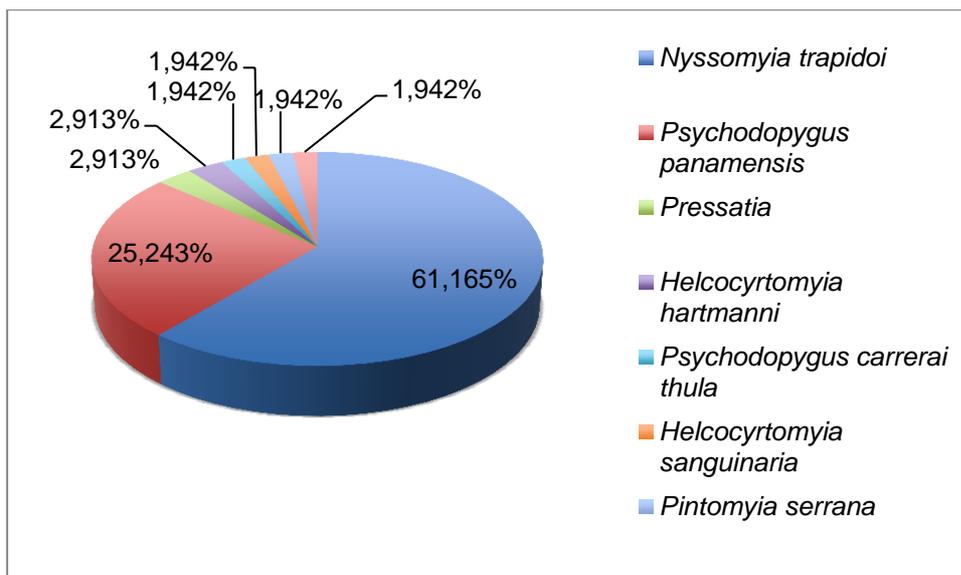
Species	CDC Light trap		Human bait		Animal burrows		Trees		Total
	No.	%	No.	%	No	%	No.	%	
<i>Lutzomyia reburra</i>	32	2.2	1	0.06	1,395	59.3			1428
<i>Lu. hartmanni</i>	509	34.8	313	21.0	2	0.08	1	1.6	825
<i>Lu. gomezi</i>	152	10.4	589	39.5			4	6.7	745
<i>Lu. trapidoi</i>	357	24.4	306	20.5	10	0.4	1	1.6	674
<i>Lu. triramula</i>	7	0.4			546	23.2			553
<i>Lu. panamensis</i> (Shannon)	77	5.3	89	6.0					166
<i>Lu. olmeca bicolor</i>	142	9.7	2	0.1					144
<i>Lu. sanguinaria</i> (Fairchild & Hertig)	16	1.1	117	7.8	2	0.08			135
<i>Lu. carpenteri</i>	9	0.7			124	5.3			133
<i>Lu. carrerai thula</i> Young	32	2.2	62	4.2					94
<i>Lu. aragaoi</i> (Costa Lima)	12	0.8			76	3.2	2	3.4	90
<i>Lu. camposi</i> (Rodríguez)					77	3.3			77
<i>Lu. trinidadensis</i> (Newstead)	51	3.5	2	0.13					53
<i>Lu. saulensis</i> (Floch & Abonnenc)	10	0.7			33	1.4			43
<i>Lu. isovespertilionis</i>	3	0.2					29	49	32
<i>Lu. aclydifera</i>	3	0.2					21	35	24
<i>Lu. sordelli</i> (Shannon & Del Ponte)	21	1.4							21
<i>Lu. barrettoi</i> sp.	1	0.06			13	0.55			14
<i>Lu. ayrozai</i> (Barreto & Coutinho)	2	0.06	3	0.19					5
<i>Lu. carrerai</i> sp.	5	0.3							5
<i>Lu. shannoni</i> (Dyar)	3	0.2	1	0.06			1	1.6	5
<i>Lu. guyanensis</i> (Floch & Abonnenc)	3	0.2	1	0.06					4
<i>Lu. barrettoi mayuscula</i> Young					3	0.12			3
<i>Lu. bifoliata</i> Osorno- Mesa, Morales, Osorno & Hoyos	3	0.2							3
<i>Lu. caprina</i> Osorno- Mesa, Morales & Osorno			4		1	0.04			1
<i>Lu. (micropygomyia)</i> sp. Barreto	1	0.06							1
<i>Lu. ovallesi</i> (Ortiz)	1	0.06							1
<i>Lu. (Psathyromyia)</i> sp. Barreto	1	0.06							1
<i>Lu. triacantha</i> (Mangabeira)			1	0.06					1
<i>Lu. recurva</i> Young	1	0.06							1
<i>Lu. rorotaensis</i> (Floch & Abonnenc)	1	0.06							1
<i>Lu. yuilli</i>	1	0.06							1
<i>Lutzomyia</i> sp <sub>1</sub>	3	0.2	14	0.9					17
<i>Lutzomyia</i> sp <sub>2</sub>	1	0.06							1
<i>Lu. flaviscutellata</i> (Mangabeira)	2	0.06							2
<i>Lu. ubiquitous</i> (Mangabeira)			4	0.2					4
<i>Lutzomyia</i> sp <sub>3</sub>	1	0.06							1
<i>Brumptomyia galindoi</i> (Fairchild & Hertig)	1	0.06			25	1.1			26
<i>B. leopoldoi</i> (Rodríguez)					24	1.0			24
<i>Brumptomyia</i> sp. Fran a & Parrot					1	0.04			1
<i>Warileya rotundipennis</i> Fairchild & Hertig			4	0.2					4
<i>W. nigrosacculus</i> Fairchild & Hertig			1	0.06					1
<b>Total</b>	<b>1,464</b>	<b>0</b>	<b>1,510</b>	<b>0</b>	<b>2,332</b>	<b>0</b>	<b>59</b>	<b>0</b>	<b>5,365</b>

**Figura 2: Especies de Flebótomos presentes en el Valle del chocó en Colombia.**

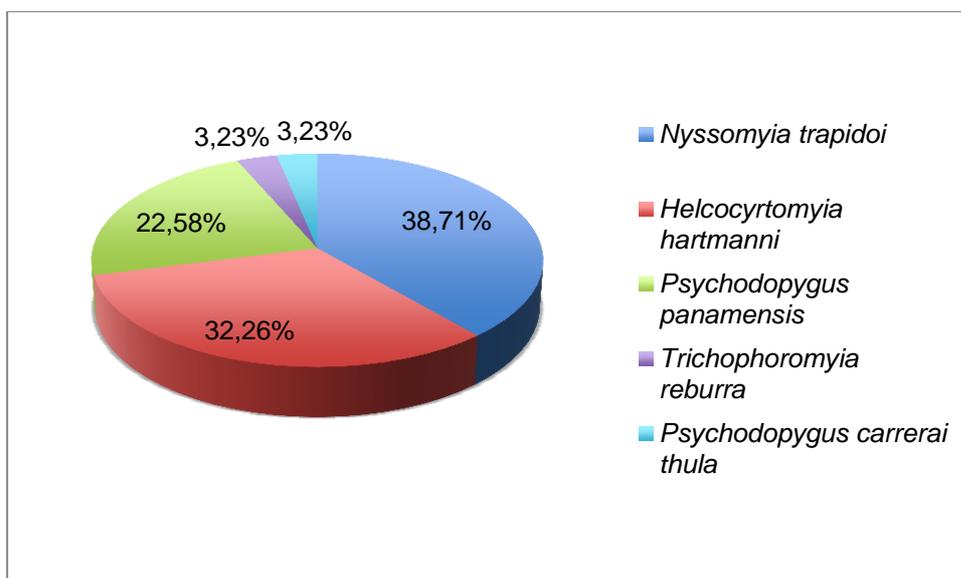
Fuente: (Duque, Vélez, Morales, & Sierra, 2004)



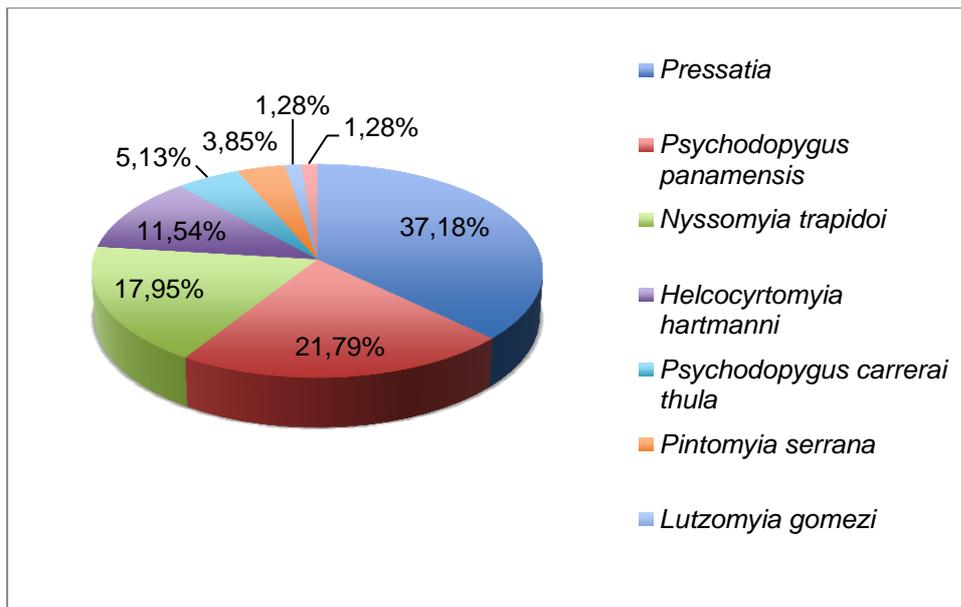
**Figura 3: Porcentaje representativo de las especies en el total de muestras analizadas**



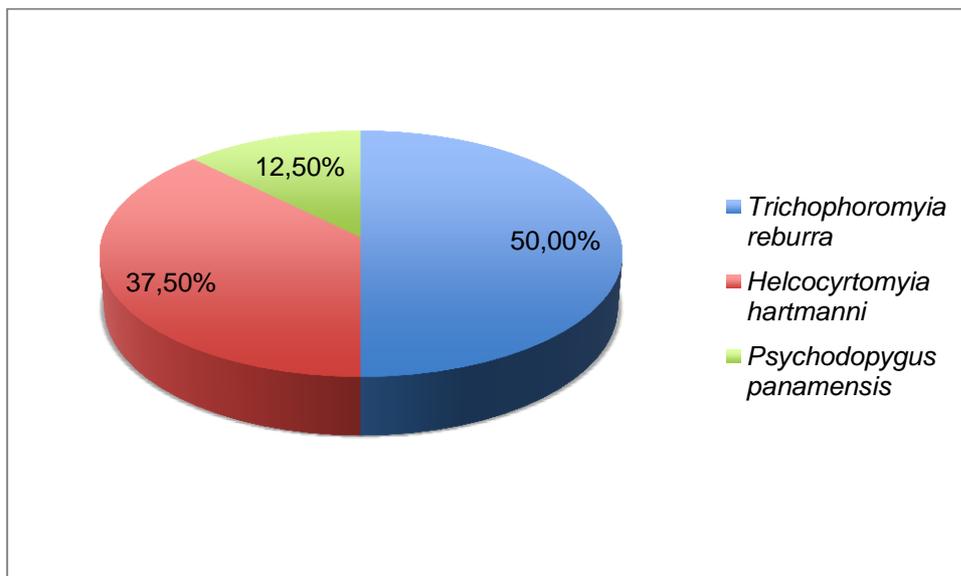
**Figura 4: Porcentaje representativo de las especies en el total de muestras analizadas para la comunidad La Ye.**



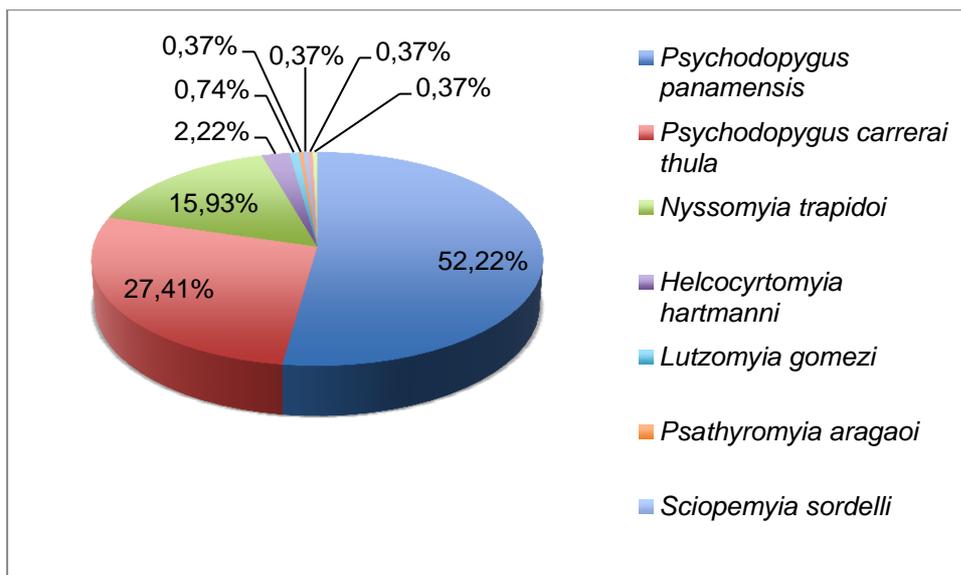
**Figura 5: Porcentaje representativo de las especies en el total de muestras analizadas para la comunidad Santa Isabel**



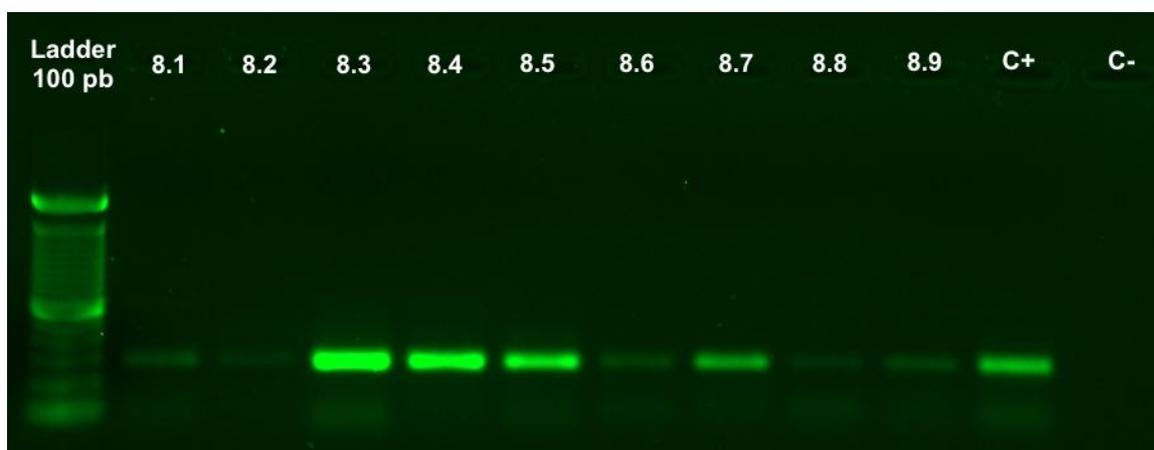
**Figura 6: Porcentaje representativo de las especies en el total de muestras analizadas para la comunidad Herrera**



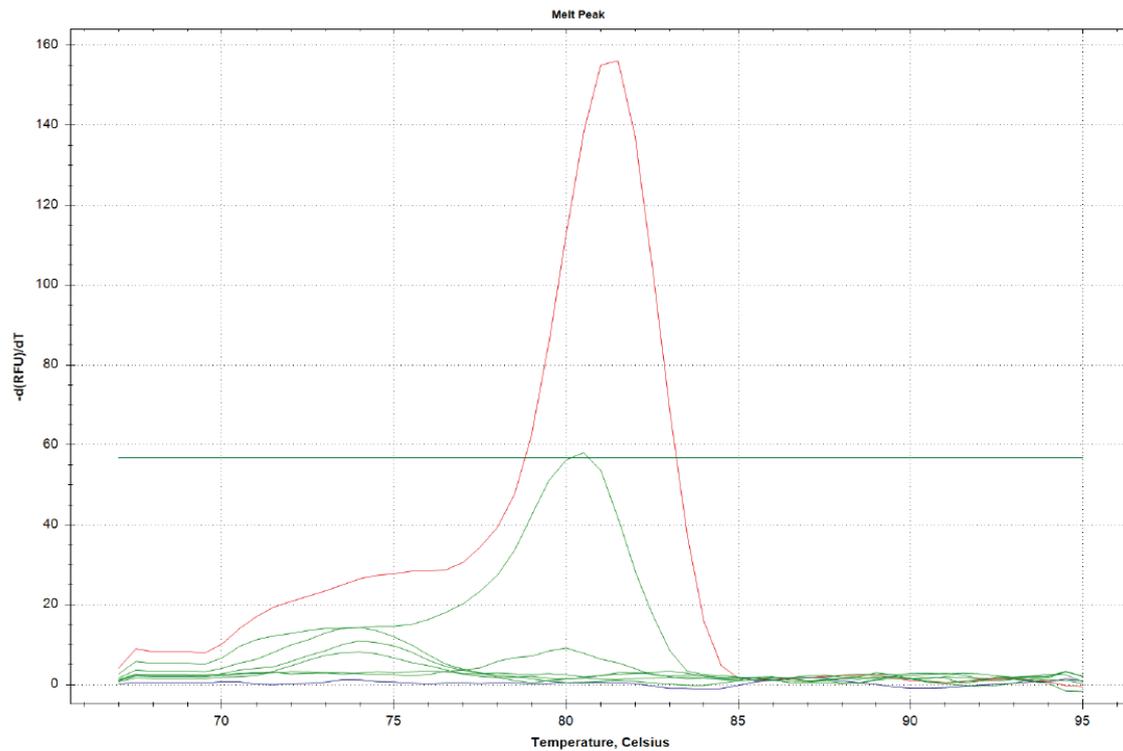
**Figura 7: Porcentaje representativo de las especies en el total de muestras analizadas para la comunidad la Yesita**



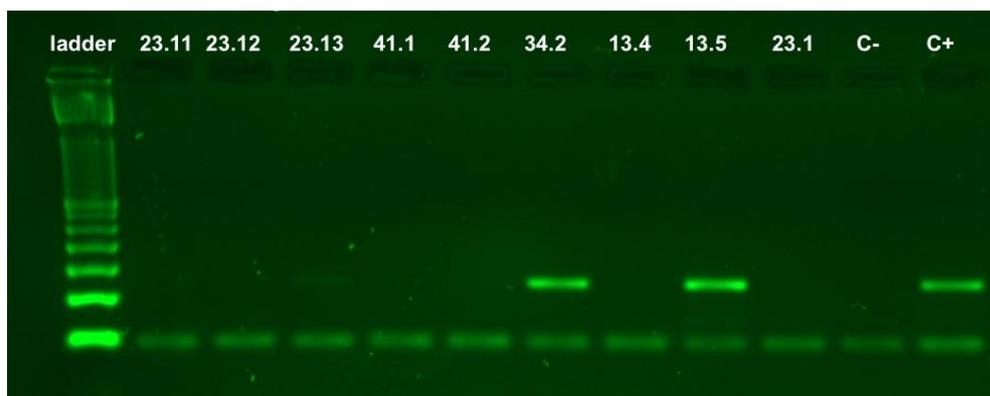
**Figura 8: Porcentaje representativo de las especies en el total de muestras analizadas para la comunidad San Andrés**



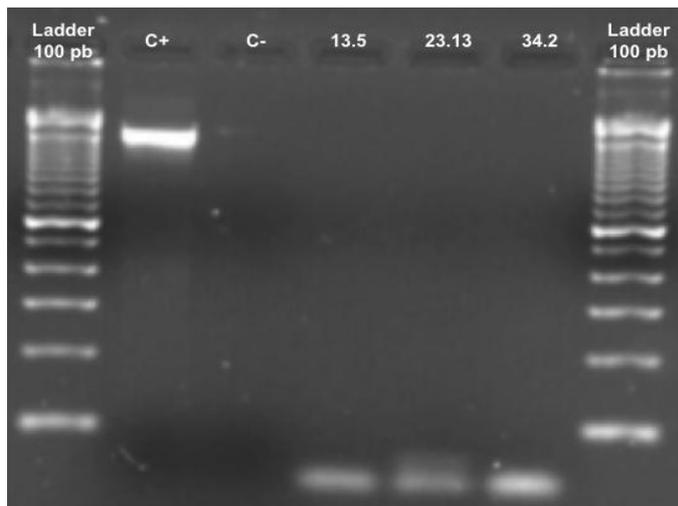
**Figura 9: Amplificación de ADN del gen de la  $\beta$ -Actina. El tamaño esperado de la banda es de 300 pb visualizada en un gel de agarosa 1%.**



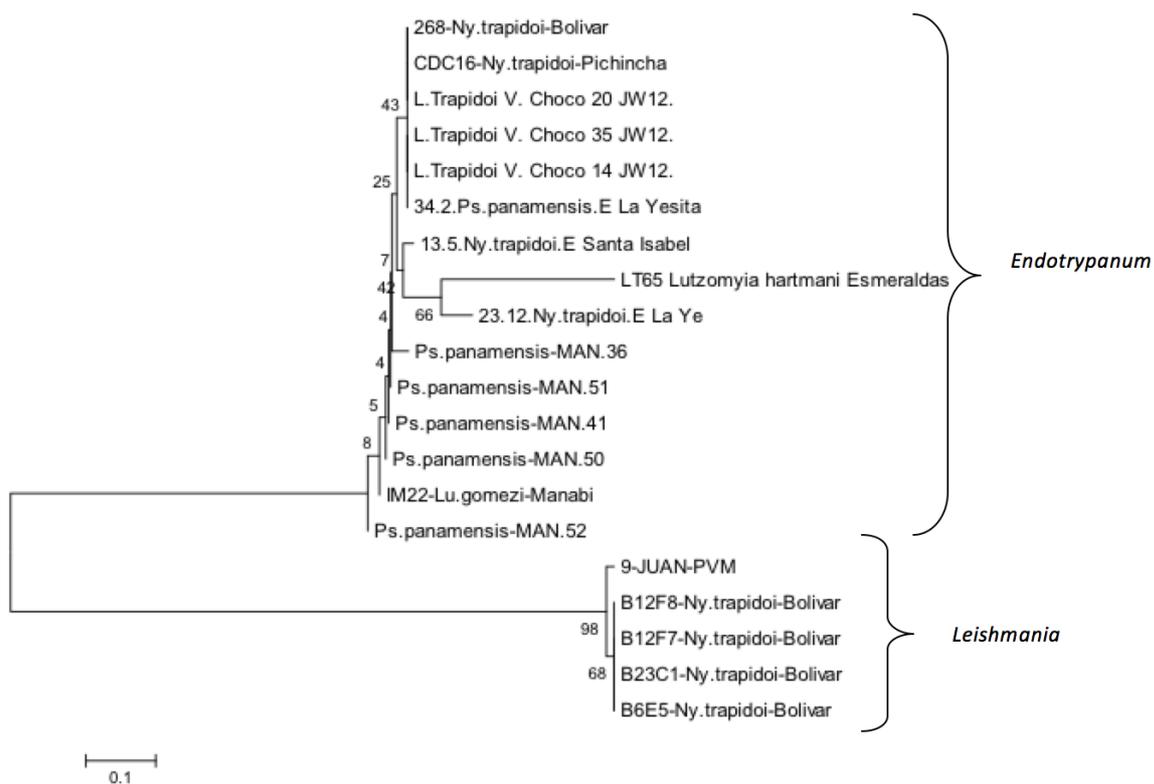
**Figura 10: Curva de Melting para amplificación de ADN de kinetoplasto usando los primers JW11-JW12. Curva Roja (control positivo), Azul (control negativo) Verde (pools analizados)**



**Figura 11: Amplificación de ADNk. El tamaño esperado de la banda es de 120 pb visualizada en un gel de agarosa 2%.**



**Figura 12: Amplificación de HSP 70. El tamaño esperado de la banda es de 120 pb visualizada en un gel de agarosa 1%.**



**Figura 13: Análisis Neighbor Joining para las secuencias positivas obtenidas.**

## TABLAS

Tabla 1: Incidencia de leishmaniasis en Ecuador.

Fuente: (Hashiguchi, et. al., 2017)

<i>Región</i>	<i>Provincia</i>	<i>Años</i>														<i>Total</i>
		<i>2001</i>	<i>2002</i>	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2005</i>	<i>2006</i>	<i>2007</i>	<i>2008</i>	<i>2009</i>	<i>2010</i>	<i>2011</i>	<i>2012</i>	<i>2013</i>	<i>2014</i>	
<i>Costa</i>	<i>Esmeraldas</i>	429	276	265	692	446	217	125	241	225	127	122	207	79	136	3587
	<i>Manabí</i>	504	125	402	585	350	96	81	120	220	101	55	59	1	16	2715
	<i>Los Ríos</i>	39	41	35	66	59	55	63	78	33	110	35	47	55	26	742
	<i>Guayas</i>	30	26	26	49	26	72	23	13	27	17	9	3	1	27	349
	<i>Sta. Elena</i>											1		5	0	6
	<i>El Oro</i>	8	12	22	23	5	9	11	19	40	23	13	6	11	30	232
<i>Sierra</i>	<i>Pichincha</i>	343	286	196	415	384	386	242	393	393	353	239	281	115	262	4288

	<b>Bolivar</b>	68	52	91	175	189	107	36	82	62	129	73	74	34	41	1213
	<b>Sto. Domingo</b>									114	99	59	120	117	148	657
	<b>Imbabura</b>	6	17	43	26	30	60	63	44	74	92	51	28	79	19	632
	<b>Cotopaxi</b>	25	29	23	37	38	25	15	7	5	21	15	7	2	10	259
	<b>Carchi</b>		3	1			0		6	7	9	4	2	5	8	45
	<b>Azuay</b>	9	1		16	6	1	7	6	4	4	1	2	2	14	73
	<b>Cañar</b>		3	4	30	18	11	8	4	14	3	5	3	5	2	110
	<b>Loja</b>	3	10		3	1	10	2	1	1	2	1	5	4	12	55
	<b>Chimborazo</b>	20	14	15	12	15	15	20	12	2	1	12	14	9	6	167
	<b>Tungurahua</b>	1														1
<b>Amazonía</b>	<b>Morona</b>	53	143	25	113	107	156	183	145	175	140	268	215	111	87	1921

	<b><i>Orellana</i></b>	49	47	55	54	96	118	116	121	140	133	113	246	113	94	1495
	<b><i>Zamora</i></b>	36	68	65	94	54	65	36	27	42	92	128	50	32	26	815
	<b><i>Sucumbíos</i></b>	36	26	18	33	45	65	65	74	60	68	53	41	15	88	687
	<b><i>Napo</i></b>	34	51	46	55	39	39	48	40	43	59	74	53	13	69	663
	<b><i>Pastaza</i></b>	61	23	4	16	17	29	41	46	54	46	54	49	91	62	593
<b><i>Total</i></b>		1754	1253	1336	2494	1925	1536	1186	1479	1735	1629	1385	1512	899	1183	21305

**Tabla 2: Atenciones de morbilidad brindadas a pacientes por Zona, Provincia, Cantón, Parroquia, Distrito, Establecimiento de Salud y Causa Por Sexo, Edad y Tipo.**

Fuente: (MSP, 2015)

CANTON	PARROQUIA	ESTABLECIMIENTO	CAUSA	SEXO	EDAD	PRIMERA	SUBSECUENTE	TOTAL
ATACAMES	ATACAMES	ATACAMES - 24 HS	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	3	2		2
ATACAMES	ATACAMES	ATACAMES - 24 HS	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	13	1		1
ATACAMES	ATACAMES	ATACAMES - 24 HS	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	22		13	13
ATACAMES	ATACAMES	ATACAMES - 24 HS	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	25	1		1
ATACAMES	ATACAMES	ATACAMES - 24 HS	Leishmaniasis	HOMBRE	27	1	1	2

			cutanea					
ATACAMES	ATACAMES	ATACAMES - 24 HS	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	31	2		2
ATACAMES	ATACAMES	ATACAMES - 24 HS	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	85	1		1
ATACAMES	ATACAMES	ATACAMES - 24 HS	Leishmaniasis cutanea	MUJER	4	1		1
ATACAMES	ATACAMES	ATACAMES - 24 HS	Leishmaniasis cutanea	MUJER	5		1	1
ATACAMES	ATACAMES	ATACAMES - 24 HS	Leishmaniasis cutanea	MUJER	31		2	2
ATACAMES	ATACAMES	ATACAMES - 24 HS	Leishmaniasis cutanea	MUJER	34	1		1

ATACAMES	ATACAMES	HOSPITAL BASICO DE ATACAMES - JUAN CARLOS GUASTI	Leishmaniasis cutanea	MUJER	57		1	1
ATACAMES	LA UNIÓN	UNION DE ATACAMES	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	4	1		1
ATACAMES	LA UNIÓN	UNION DE ATACAMES	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	5	1	2	3
ATACAMES	LA UNIÓN	UNION DE ATACAMES	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	6	1	5	6
ATACAMES	LA UNIÓN	UNION DE ATACAMES	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	11	1	2	3
ATACAMES	LA UNIÓN	UNION DE ATACAMES	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	12	1	4	5

ATACAMES	LA UNIÓN	UNION DE ATACAMES	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	22		1	1
ATACAMES	LA UNIÓN	UNION DE ATACAMES	Leishmaniasis cutanea	MUJER	0		1	1
ATACAMES	LA UNIÓN	UNION DE ATACAMES	Leishmaniasis cutanea	MUJER	6	1		1
ATACAMES	LA UNIÓN	UNION DE ATACAMES	Leishmaniasis cutanea	MUJER	7	1		1
ATACAMES	LA UNIÓN	UNION DE ATACAMES	Leishmaniasis cutanea	MUJER	8		3	3
ATACAMES	LA UNIÓN	UNION DE ATACAMES	Leishmaniasis cutanea	MUJER	50	1		1
ATACAMES	LA UNIÓN	UNION DE ATACAMES	Leishmaniasis no	MUJER	0	1		1

			especificada					
ATACAMES	SÚA (CAB. EN LA BOCANA)	SUA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	3	2	2	4
ATACAMES	SÚA (CAB. EN LA BOCANA)	SUA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	41	1	1	2
ATACAMES	TONCHIGÜE	TONCHIGUE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	9	1	1	2
ATACAMES	TONCHIGÜE	TONCHIGUE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	15	1		1
ATACAMES	TONCHIGÜE	TONCHIGUE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	20	1		1
ATACAMES	TONCHIGÜE	TONCHIGUE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	21	1		1

ATACAMES	TONCHIGÜE	TONCHIGUE	Leishmaniasis cutanea	MUJER	3	1		1
ATACAMES	TONCHIGÜE	TONCHIGUE	Leishmaniasis cutanea	MUJER	6		1	1
ATACAMES	TONSUPA	SAN CARLOS TONSUPA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	9		1	1
ATACAMES	TONSUPA	SAN CARLOS TONSUPA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	15		2	2
ATACAMES	TONSUPA	SAN CARLOS TONSUPA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	16	1		1
ATACAMES	TONSUPA	SAN CARLOS TONSUPA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	33		2	2
ATACAMES	TONSUPA	SAN CARLOS TONSUPA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	43		2	2

ATACAMES	TONSUPA	SAN CARLOS TONSUPA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	0	1		1
ATACAMES	TONSUPA	SAN CARLOS TONSUPA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	3	1		1
ATACAMES	TONSUPA	SAN CARLOS TONSUPA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	48		1	1
ELOY ALFARO	ATAHUALPA (CAB. EN CAMARONES)	ATAHUALPA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	26	1		1
ELOY ALFARO	BORBÓN	UNIDAD ANIDADA HOSPITAL BASICO DE BORBON	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	39	1		1
ELOY ALFARO	SAN FRANCISCO DE	SAN FRANCISCO DE ONZOLE	Leishmaniasis no	HOMBRE	56		1	1

	ONZOLE		especificada					
ELOY ALFARO	TIMBIRÉ	TIMBIRE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	46		2	2
ESMERALDAS	CAMARONES (CAB. EN SAN VICENTE)	CAMARONES	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	5	1	1	2
ESMERALDAS	CAMARONES (CAB. EN SAN VICENTE)	CAMARONES	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	11	1		1
ESMERALDAS	CAMARONES (CAB. EN SAN VICENTE)	CAMARONES	Leishmaniasis cutanea	MUJER	3	2	1	3

ESMERALDAS	CAMARONES (CAB. EN SAN VICENTE)	CAMARONES	Leishmaniasis cutanea	MUJER	10	1		1
ESMERALDAS	CAMARONES (CAB. EN SAN VICENTE)	CAMARONES	Leishmaniasis cutanea	MUJER	51	1		1
ESMERALDAS	CHINCA	CHAFLU	Leishmaniasis cutanea	MUJER	6		7	7
ESMERALDAS	CRNEL. CARLOS CONCHA TORRES (CAB.EN HUELE)	CARLOS CONCHA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	6	1		1

ESMERALDAS	CRNEL. CARLOS CONCHA TORRES (CAB.EN HUELE)	CARLOS CONCHA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	9	1	2	3
ESMERALDAS	CRNEL. CARLOS CONCHA TORRES (CAB.EN HUELE)	CARLOS CONCHA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	19	1		1
ESMERALDAS	CRNEL. CARLOS CONCHA	CARLOS CONCHA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	3	1		1

	TORRES (CAB.EN HUELE)							
ESMERALDAS	CRNEL. CARLOS CONCHA TORRES (CAB.EN HUELE)	CARLOS CONCHA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	15	1		1
ESMERALDAS	CRNEL. CARLOS CONCHA TORRES (CAB.EN HUELE)	CARLOS CONCHA	Leishmaniasis no especificada	HOMBRE	5	1		1

ESMERALDAS	CRNEL. CARLOS CONCHA TORRES (CAB.EN HUELE)	CARLOS CONCHA	Leishmaniasis no especificada	MUJER	8	1		1
ESMERALDAS	CRNEL. CARLOS CONCHA TORRES (CAB.EN HUELE)	CARLOS CONCHA	Leishmaniasis no especificada	MUJER	9	1		1
ESMERALDAS	CRNEL. CARLOS CONCHA	CARLOS CONCHA	Leishmaniasis no especificada	MUJER	10	1		1

	TORRES (CAB.EN HUELE)							
ESMERALDAS	CRNEL. CARLOS CONCHA TORRES (CAB.EN HUELE)	CARLOS CONCHA	Leishmaniasis no especificada	MUJER	11	1		1
ESMERALDAS	CRNEL. CARLOS CONCHA TORRES (CAB.EN HUELE)	CARLOS CONCHA	Leishmaniasis no especificada	MUJER	14	1		1

ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD N. 1	Leishmaniasis no especificada	MUJER	3	1	1	2
ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD N. 1	Leishmaniasis no especificada	MUJER	17	1		1
ESMERALDAS	ESMERALDAS	LA PROPICIA II	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	25		2	2
ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD N. 2	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	46		1	1
ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD N. 2	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	47		3	3
ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD N. 2	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	55		1	1

ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD N. 2	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	56		6	6
ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD N. 2	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	59		1	1
ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD N. 2	Leishmaniasis mucocutanea	HOMBRE	47		1	1
ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD N. 2	Leishmaniasis no especificada	HOMBRE	46	1		1
ESMERALDAS	ESMERALDAS	SAN JOSE COTTOLENGO (BELLAVISTA)	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	51	1	2	3
ESMERALDAS	ESMERALDAS	EL ARENAL	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	27	1		1

ESMERALDAS	ESMERALDAS	EL ARENAL	Leishmaniasis cutanea	MUJER	17	1		1
ESMERALDAS	ESMERALDAS	LOS ALMENDROS	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	14	1	1	2
ESMERALDAS	ESMERALDAS	HOSPITAL GENERAL DELFINA TORRES DE CONCHA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	41	1		1
ESMERALDAS	ESMERALDAS	HOSPITAL GENERAL DELFINA TORRES DE CONCHA	Leishmaniasis no especificada	MUJER	20		1	1
ESMERALDAS	ESMERALDAS	HM 2	Leishmaniasis cutanea	MUJER	2	1		1
ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD SAN RAFAEL	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	11	1		1

ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD SAN RAFAEL	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	20	1		1
ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD SAN RAFAEL	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	21	1		1
ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD SAN RAFAEL	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	30	1		1
ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD SAN RAFAEL	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	39	1		1
ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD SAN RAFAEL	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	67	1	1	2
ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD SAN RAFAEL	Leishmaniasis cutanea	MUJER	36	1		1
ESMERALDAS	ESMERALDAS	CENTRO DE SALUD SAN RAFAEL	Leishmaniasis mucocutanea	HOMBRE	67		1	1

ESMERALDAS	SAN MATEO	SAN MATEO	Leishmaniasis cutanea	MUJER	0	1		1
ESMERALDAS	TACHINA	TACHINA	Leishmaniasis visceral	HOMBRE	11		1	1
ESMERALDAS	TACHINA	TACHINA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	10	1		1
ESMERALDAS	TACHINA	TACHINA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	45	2	1	3
ESMERALDAS	TACHINA	TACHINA	Leishmaniasis no especificada	HOMBRE	11	1		1
ESMERALDAS	TACHINA	TACHINA	Leishmaniasis no especificada	HOMBRE	17		1	1

MUISNE	GALERA	GALERA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	3	1		1
MUISNE	GALERA	GALERA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	4		1	1
MUISNE	GALERA	GALERA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	5	1	1	2
MUISNE	GALERA	ESTERO DE PLATANO	Leishmaniasis no especificada	MUJER	12	1		1
MUISNE	MUISNE	SAN MIGUEL DE BILSA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	9	1		1
MUISNE	MUISNE	SAN MIGUEL DE BILSA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	19	1		1

MUISNE	MUISNE	HOSPITAL BASICO DE MUISNE - CARLOS DEL POZO	Leishmaniasis cutanea	MUJER	20	1		1
MUISNE	MUISNE	HOSPITAL BASICO DE MUISNE - CARLOS DEL POZO	Leishmaniasis cutanea	MUJER	55	1		1
MUISNE	MUISNE	UNIDAD ANIDADA HOSPITAL BASICO DE MUISNE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	15	1		1
MUISNE	MUISNE	UNIDAD ANIDADA HOSPITAL BASICO DE MUISNE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	20	1	1	2
MUISNE	SAN GREGORIO	SAN GREGORIO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	8	1	2	3

MUISNE	SAN GREGORIO	SAN GREGORIO	Leishmaniasis cutanea	MUJER	26	1	1	2
MUISNE	SAN JOSÉ DE CHAMANGA (CAB.EN CHAMANGA)	CHAMANGA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	15	1	3	4
MUISNE	SAN JOSÉ DE CHAMANGA (CAB.EN CHAMANGA)	CHAMANGA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	41		1	1
QUININDÉ	CUBE	LA Y DE LA LAGUNA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	20	1	1	2
QUININDÉ	CUBE	LA Y DE LA LAGUNA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	21	1	1	2

QUININDÉ	CUBE	LA Y DE LA LAGUNA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	3	1		1
QUININDÉ	CUBE	LA Y DE LA LAGUNA	Leishmaniasis cutanea	MUJER	5		2	2
QUININDÉ	CUBE	LA Y DE LA LAGUNA	Leishmaniasis no especificada	MUJER	22	1		1
QUININDÉ	CUBE	CUBE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	13	1	1	2
QUININDÉ	CUBE	CHUCAPLE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	36	1	6	7
QUININDÉ	CUBE	CHUCAPLE	Leishmaniasis cutanea	MUJER	35	1	5	6
QUININDÉ	CUBE	CHUCAPLE	Leishmaniasis	MUJER	65	1	5	6

			cutanea					
QUININDÉ	LA UNIÓN	UNION DE QUININDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	31	1	1	2
QUININDÉ	LA UNIÓN	UNION DE QUININDE	Leishmaniasis cutanea	MUJER	30	1	1	2
QUININDÉ	LA UNIÓN	UNION DE QUININDE	Leishmaniasis cutanea	MUJER	31		1	1
QUININDÉ	LA UNIÓN	UNION DE QUININDE	Leishmaniasis cutanea	MUJER	36	1	2	3
QUININDÉ	ROSA ZÁRATE (QUININDÉ)	SIMON BOLIVAR LA SEXTA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	1	1		1
QUININDÉ	ROSA ZÁRATE (QUININDÉ)	SIMON BOLIVAR LA SEXTA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	18	1		1

QUININDÉ	ROSA ZÁRATE (QUININDÉ)	SIMON BOLIVAR LA SEXTA	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	19	1		1
QUININDÉ	ROSA ZÁRATE (QUININDÉ)	HOSPITAL BASICO DE QUININDE - ALBERTO BUFFONNY	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	27		1	1
QUININDÉ	ROSA ZÁRATE (QUININDÉ)	SAN ROQUE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	71		1	1
QUININDÉ	ROSA ZÁRATE (QUININDÉ)	UNIDAD ANIDADA HOSPITAL BASICO DE QUININDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	12	2		2
QUININDÉ	ROSA ZÁRATE (QUININDÉ)	UNIDAD ANIDADA HOSPITAL BASICO DE QUININDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	13		1	1

QUININDÉ	ROSA ZÁRATE (QUININDÉ)	UNIDAD ANIDADA HOSPITAL BASICO DE QUININDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	18	2		2
QUININDÉ	ROSA ZÁRATE (QUININDÉ)	UNIDAD ANIDADA HOSPITAL BASICO DE QUININDE	Leishmaniasis cutanea	MUJER	4	1	1	2
QUININDÉ	VICHE	VICHE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	7		1	1
QUININDÉ	VICHE	VICHE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	18	1		1
QUININDÉ	VICHE	VICHE	Leishmaniasis no especificada	HOMBRE	18		1	1
RIOVERDE	CHONTADURO	CHONTADURO	Leishmaniasis	HOMBRE	4	1		1

			cutanea					
RIOVERDE	CHONTADURO	CHONTADURO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	5		1	1
RIOVERDE	CHONTADURO	CHONTADURO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	7	2		2
RIOVERDE	CHONTADURO	CHONTADURO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	12		1	1
RIOVERDE	CHONTADURO	CHONTADURO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	14	1		1
RIOVERDE	CHONTADURO	CHONTADURO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	15		1	1
RIOVERDE	CHONTADURO	CHONTADURO	Leishmaniasis cutanea	MUJER	31	1		1

RIOVERDE	CHONTADURO	CHONTADURO	Leishmaniasis no especificada	HOMBRE	10	1		1
RIOVERDE	CHONTADURO	CHONTADURO	Leishmaniasis no especificada	MUJER	12	1		1
RIOVERDE	CHONTADURO	VENADO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	10	1		1
RIOVERDE	CHUMUNDÉ	CHUMUNDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	12	1		1
RIOVERDE	CHUMUNDÉ	CHUMUNDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	13	1	1	2
RIOVERDE	CHUMUNDÉ	CHUMUNDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	17		5	5

RIOVERDE	CHUMUNDÉ	CHUMUNDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	19	1		1
RIOVERDE	CHUMUNDÉ	CHUMUNDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	21	1	11	12
RIOVERDE	CHUMUNDÉ	CHUMUNDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	24	1		1
RIOVERDE	CHUMUNDÉ	CHUMUNDE	Leishmaniasis cutanea	MUJER	13	1	10	11
RIOVERDE	CHUMUNDÉ	CHUMUNDE	Leishmaniasis mucocutanea	MUJER	13		1	1
RIOVERDE	CHUMUNDÉ	CHUMUNDE	Leishmaniasis mucocutanea	MUJER	20		1	1
RIOVERDE	CHUMUNDÉ	CAPULI	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	4	1		1

RIOVERDE	CHUMUNDÉ	CAPULI	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	8	1		1
RIOVERDE	CHUMUNDÉ	CAPULI	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	30		1	1
RIOVERDE	LAGARTO	LAGARTO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	9	1		1
RIOVERDE	LAGARTO	LAGARTO	Leishmaniasis cutanea	MUJER	12	1		1
RIOVERDE	MONTALVO (CAB. EN HORQUETA)	MONTALVO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	3		2	2
RIOVERDE	MONTALVO (CAB. EN HORQUETA)	MONTALVO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	4	1		1

RIOVERDE	MONTALVO (CAB. EN HORQUETA)	MONTALVO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	14	1		1
RIOVERDE	MONTALVO (CAB. EN HORQUETA)	MONTALVO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	61		1	1
RIOVERDE	MONTALVO (CAB. EN HORQUETA)	MONTALVO	Leishmaniasis cutanea	MUJER	13	1		1
RIOVERDE	MONTALVO (CAB. EN HORQUETA)	MONTALVO	Leishmaniasis cutanea	MUJER	16	1		1
RIOVERDE	MONTALVO (CAB. EN HORQUETA)	MONTALVO	Leishmaniasis cutanea	MUJER	22	1		1

	HORQUETA)							
RIOVERDE	MONTALVO (CAB. EN HORQUETA)	PROGRESO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	2	1	3	4
RIOVERDE	MONTALVO (CAB. EN HORQUETA)	PROGRESO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	6	1	2	3
RIOVERDE	MONTALVO (CAB. EN HORQUETA)	PROGRESO	Leishmaniasis cutanea	MUJER	4		3	3
RIOVERDE	MONTALVO (CAB. EN HORQUETA)	PROGRESO	Leishmaniasis cutanea	MUJER	8	1	5	6

RIOVERDE	MONTALVO (CAB. EN HORQUETA)	PROGRESO	Leishmaniasis cutanea	MUJER	42	1	1	2
RIOVERDE	RIOVERDE	RIO VERDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	3		1	1
RIOVERDE	RIOVERDE	RIO VERDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	5	1		1
RIOVERDE	RIOVERDE	RIO VERDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	6		1	1
RIOVERDE	RIOVERDE	RIO VERDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	8		1	1
RIOVERDE	RIOVERDE	RIO VERDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	13	1		1
RIOVERDE	RIOVERDE	RIO VERDE	Leishmaniasis	MUJER	2		1	1

			cutanea					
RIOVERDE	RIOVERDE	RIO VERDE	Leishmaniasis cutanea	MUJER	5	1	2	3
RIOVERDE	RIOVERDE	RIO VERDE	Leishmaniasis cutanea	MUJER	6	1		1
RIOVERDE	RIOVERDE	RIO VERDE	Leishmaniasis cutanea	MUJER	14	1		1
RIOVERDE	RIOVERDE	RIO VERDE	Leishmaniasis no especificada	HOMBRE	3	1		1
RIOVERDE	RIOVERDE	RIO VERDE	Leishmaniasis no especificada	HOMBRE	6	1		1

RIOVERDE	RIOVERDE	RIO VERDE	Leishmaniasis no especificada	HOMBRE	8		1	1
RIOVERDE	RIOVERDE	SAN VICENTE DE RIO VERDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	6	1		1
RIOVERDE	RIOVERDE	SAN VICENTE DE RIO VERDE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	15	1	1	2
RIOVERDE	RIOVERDE	SAN VICENTE DE RIO VERDE	Leishmaniasis cutanea	MUJER	1	1		1
RIOVERDE	RIOVERDE	SAN VICENTE DE RIO VERDE	Leishmaniasis cutanea	MUJER	3	1		1
RIOVERDE	ROCAFUERTE	ROCAFUERTE	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	9	1		1

SAN LORENZO	MATAJE (CAB. EN SANTANDER)	MATAJE	Leishmaniasis cutanea	MUJER	9	1		1
SAN LORENZO	SAN LORENZO	SAN LORENZO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	22	1		1
SAN LORENZO	SAN LORENZO	SAN LORENZO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	24	2		2
SAN LORENZO	SAN LORENZO	SAN LORENZO	Leishmaniasis cutanea	HOMBRE	62	1		1



	<i>Sto. Domingo</i>			X		X	X								3
	<i>Imbabura</i>		X	X		X	X								4
	<i>Cotopaxi</i>			X	X	X									3
	<i>Carchi</i>														
	<i>Azuay</i>	X								X					2
	<i>Cañar</i>	X	X	X	X	X	X								6
	<i>Loja</i>	X						X		X					2
	<i>Chimborazo</i>	X	X	X	X	X	X	X		X					8
	<i>Tungurahua</i>														
	<i>Morona</i>	X	X	X	X			X	X		X	X			8
<i>Amazonía</i>	<i>Orellana</i>	X	X					X	X	X		X	X	X	8

	<i>Zamora</i>	x	x					x	x						4
	<i>Sucumbios</i>	x	x		x			x			x		x	x	7
	<i>Napo</i>	x	x		x			x			x		x	x	7
	<i>Pastaza</i>	x							x		x				3

**Tabla 4: Datos de las trampas de luz utilizadas para la captura de los especímenes**

<b>Tubo</b>	<b>Fragmento</b>	<b>Fecha</b>	<b>Hora</b>	<b>Distancia borde m</b>	<b>Area (ha)</b>	<b>Elevación (m)</b>	<b>Distancia Bilsa (m)</b>	<b>Provincia</b>	<b>Comunidad</b>	<b>UTM1</b>	<b>UTM2</b>	<b>Elev (m)</b>
1	8	23/8/14	14:00	200	20,8	261	5839	Esmeraldas	La Ye	651893	41038	222
2	12	13/10/14	14:00	200	21,69	521	656	Esmeraldas	Santa Isabel	646837	38763	573

3	13	2/10/14	13:36	200	6,84	552	1093	Esmeraldas	Santa Isabel	646953	38518	528
4	23	20/8/14	14:00	240	25,2	342	7139	Esmeraldas	La Ye	652790	42496	339
5	24	5/12/14	13:00	200	23,69	240	9599	Esmeraldas	Herrera	655776	40703	243
6	34	3/11/14	14:10	200	30,11	523	177	Esmeraldas	La Yesita	643411	36516	601
7	39	6/11/14	14:15	200	28,14	596	11	Esmeraldas	La Yesita	644095	37708	629
8	41	5/10/14	13:15	200	2,71	567	1028	Esmeraldas	Santa Isabel	646300	38015	585
9	56	2/12/01	14:30	200	14,34	257	9882	Esmeraldas	Herrera	656050	40543	223
10	58	8/12/14	13:42	200	4,29	203	10804	Esmeraldas	Herrera	656661	40849	254

11	63	11/12/14	14:00	200	8,42	164	14009	Esmeraldas	Herrera	659632	42142	177
12	75	17/8/14	14:00	180	34,06	399	7061	Esmeraldas	La Ye	652029	43773	389
13	77	16/9/14	13:50	200	15,76	159	16773	Esmeraldas	San Andres	661983	44223	300
14	78	14/9/14	13:45	200	10,05	154	16951	Esmeraldas	San Andres	662201	44599	166
15	79	4/9/14	14:30	200	13,75	222	15868	Esmeraldas	San Andres	661586	43167	219
16	81	9/9/14	15:00	150	4,62	147	16129	Esmeraldas	San Andres	661353	43986	154
17	82	8/10/14	14:30	200	9,34	365	2604	Esmeraldas	Santa Isabel	646672	36378	409
18	86	13/11/14	13:34	200	34,09	500	983	Esmeraldas	La Yesita	644670	36769	552

19	87	9/11/14	14:10	200	3,15	542	676	Esmeraldas	La Yesita	644473	37030	556
20	89	6/9/14	14:30	200	11,74	176	16133	Esmeraldas	San Andres	661216	44654	176
21	Bilsa	16/11/14	14:15	200	4000	513	NA	Esmeraldas	La Yesita	642980	37036	517

**Tabla 5: Concentración de reactivos del Master Mix de PCR para amplificación del gen de  $\beta$ - actina**

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración Stock</i>	<i>Concentración Final</i>	<i>Vol l RX (ul)</i>
H <sub>2</sub> O PCR			6.8
Buffer	5X	1X	5
dNTPs	2mM	0.2 mM	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	2
Primer F: 5'CGGAACCGCTCATTGCC3'	10 $\mu$ m	0.5 $\mu$ m	1.25
Primer R: 5'ACCCACACTGTGCCCATCTA 3'	10 $\mu$ m	0.5 $\mu$ m	1.25
taq	5U	1U	0.2
ADN			1

**Tabla 6: Concentración de reactivos del Master Mix de PCR para amplificación de ADNk por PCR Real Time**

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración Stock</i>	<i>Concentración Final</i>	<i>Vol l RX (ul)</i>
H <sub>2</sub> O PCR			1.7
Evergreen			5
Primer JW11F: 5' CCTATTTTACACCAACCCCCAG T 3'	50 mM	0.75 mM	0.15
Primer JW12R: 5' GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA 3'	50mM	0.75 mM	0.15
ADN			3

**Tabla 7: Concentración de reactivos del Master Mix de PCR para amplificación de ADNk por PCR Convencional**

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración Stock</i>	<i>Concentración Final</i>	<i>Vol. l. RX (ul)</i>
H <sub>2</sub> O PCR			1.6
Buffer	5X	1X	2
dNTPs	2 mM	0.2 mM	2
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5 mM	1
Primer JW11 F: 5' CCTATTTTACACCAACCCCCAG T 3'	50 mM	0.75 mM	0.15
Primer JW12 R: 5' GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA 3'	50mM	0.75 mM	0.15
taq	5U	1U	0.1
ADN			3

**Tabla 8: Concentración de reactivos del Master Mix de PCR para amplificación de HSP70 por PCR Convencional**

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración Stock</i>	<i>Concentración Final</i>	<i>Vol 1 RX (ul)</i>
H <sub>2</sub> O PCR			3.55
Buffer	5X	1X	2
dNTPs	2mM	100 uM	1
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	0.6
Primer F: 5' GACGGTGCCTGCCTACTTCAA 3'	10 uM	0.4 uM	0.4
Primer R: 5' CCGCCATGCTCTGGTACATC 3'	10 uM	0.4 uM	0.4
taq	5U	0.025 U	0.05
ADN			2

**Tabla 9: Resultados de la colección entomológica**

Sitio	Fragmento	Machos	Hembras
1	8	49	77
2	12	10	7
3	13	11	5
4	23	5	15
5	24	17	22
6	34	3	2
7	39	9	6
8	41	2	20
9	56	29	13
10	58	16	17
11	63	5	25
12	75	9	11
13	77	64	123
14	78	3	143
15	79	41	36
Total		273	522
Porcentaje		34,3396226 4	65,6603773 6

**Tabla 10: Número de individuos encontrados por cada especie en los diferentes sitios de las comunidades estudiadas**

<b>Fragmento Comunidad “La Ye”</b>	<b>Especie</b>	<b>Individuos</b>
1	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	2
	<i>Psychodopygus panamensis</i>	25
	<i>Pressatia</i>	3
	<i>Helcocyrtomyia sanguinaria</i>	1
	<i>Pintomyia serrana</i>	2
	<i>Nyssomyia trapedoi</i>	44
4	<i>Nyssomyia trapedoi</i>	15
12	<i>Psychodopygus panamensis</i>	1
	<i>Nyssomyia trapedoi</i>	4
	<i>Helcocyrtomyia hartmanni</i>	3
	<i>Helcocyrtomyia sanguinaria</i>	1
	<i>Pressatia</i>	2
Total		103

<b>Fragmento comunidad Santa Isabel</b>	<b>Especie</b>	<b>Individuos</b>
2	<i>Psychodopygus panamensis</i>	1
	<i>Trichophoromyia reburra</i>	1
	<i>Nyssomyia trapedoi</i>	4
3	<i>Psychodopygus panamensis</i>	2
	<i>Nyssomyia trapedoi</i>	3
8	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	1
	<i>Helcocyrtomyia hartmanni</i>	10
	<i>Psychodopygus panamensis</i>	4

	<i>Nyssomyia trapedoi</i>	5
Total		31

<b>Fragmento comunidad Herrera</b>	<b>Especie</b>	<b>Individuos</b>
5	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	3
	<i>Helcocyrtomyia hartmanni</i>	1
	<i>Psychodopygus panamensis</i>	7
	<i>Pressatia</i>	7
	<i>Pintomyia serrana</i>	1
	<i>Nyssomyia trapedoi</i>	3
9	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	1
	<i>Helcocyrtomyia hartmanni</i>	3
	<i>Psychodopygus panamensis</i>	5
	<i>Pressatia</i>	3
	<i>Nyssomyia trapedoi</i>	1
10	<i>Helcocyrtomyia hartmanni</i>	3
	<i>Psychodopygus panamensis</i>	1
	<i>Pressatia</i>	8
	<i>Pintomyia serrana</i>	2
	<i>Nyssomyia trapedoi</i>	3
11	<i>Lutzomyia gomezi</i>	1
	<i>Helcocyrtomyia hartmanni</i>	2
	<i>Psychodopygus panamensis</i>	4
	<i>Pressatia</i>	11
	<i>Nyssomyia trapedoi</i>	7
	<i>Pintomyia ovallesi</i>	1
Total		78

<b>Fragmento comunidad La Yesita</b>	<b>Especie</b>	<b>Individuos</b>
6	<i>Trichophoromyia reburra</i>	1
	<i>Psychodopygus panamensis</i>	1
7	<i>Helcocyrtomyia hartmanni</i>	3
	<i>Trichophoromyia reburra</i>	3
Total		8

<b>Fragmento comunidad San Andrés</b>	<b>Especie</b>	<b>Individuos</b>
13	<i>Psathyromyia aragaoi</i>	1
	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	24
	<i>Lutzomyia gomezi</i>	2
	<i>Helcocyrtomyia hartmanni</i>	5
	<i>Psychodopygus panamensis</i>	60
	<i>Sciopemyia sordelli</i>	1
	<i>Nyssomyia trapedoi</i>	30
	<i>Viannamyia caprina</i>	1
14	<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	50
	<i>Helcocyrtomyia hartmanni</i>	1
	<i>Psychodopygus panamensis</i>	81
	<i>Pressatia</i>	1
	<i>Nyssomyia trapedoi</i>	10
15	<i>Nyssomyia trapedoi</i>	3
Total		270

**Tabla 11: Número de pools analizados en Real Time por especie**

<b>Especie</b>	<b>Pooles procesados</b>	<b>Pooles positivos</b>
<i>Nyssomyia trapidoi</i>	43	2
<i>Psychodopygus panamensis</i>	64	1
<i>Psychodopygus carrerae thula</i>	27	0
<i>Helcocyrtomyia hartmanni</i>	9	0
<i>Lutzomyia gomezi</i>	1	0
<i>Helcocyrtomyia sanguinaria</i>	0	0
<i>Pintomyia serrana</i>	2	0
<i>Trichophoromyia reburra</i>	2	0
<i>Psathyromyia aragaoi</i>	0	0
<i>Sciopemyia sordelli</i>	0	0
<i>Pressatia</i>	0	0
<i>Viannamyia caprina</i>	0	0
<i>Pintomyia ovallesi</i>	0	0
<b>Total</b>	<b>148</b>	<b>3</b>