

**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 cuatro localidades de las  
provincias de Esmeraldas y Manabí**

Proyecto de investigación.

**María José Baquero Ullauri**

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

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

Quito, 02 de mayo de 2017

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**María José Baquero**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata, Ph.D.

Firma del profesor

---

Quito, 02 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: María José Baquero

Código: 00110810

Cédula de Identidad: 1714964960

Lugar y fecha: Quito, 02 de mayo de 2017

## **DEDICATORIA**

A mi familia que ha sido un apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia y a mi novio por ser han dado todo su apoyo y un gran soporte a lo largo de mi carrera. Me han dado siempre la fuerza para seguir adelante con mis proyectos y me han impulsado a seguir mis metas.

A mis amigos de biotecnología porque nos hemos llegado a unir tanto que somos ahora un gran equipo.

Especialmente, a mi directora de Tesis, Sonia Zapata por transmitirme todo su conocimiento y por todo el apoyo que me brindó en el desarrollo de este proyecto.

## RESUMEN

La *Leishmania* es un protozooario hemoflagelado del orden Kinetoplastida y de la familia Trypanosomatidae que se transmite al ser humano a través de la picadura de un díptero hembra de la subfamilia Phlebotominae. Los amastigotes introducidos en la piel son los causantes de las lesiones cutáneas, mucocutáneas o viscerales características de la enfermedad zoonótica llamada leishmaniasis. En el Ecuador, la leishmaniasis está presente en 22 de las 24 provincias. La mayoría de los casos que se han reportado corresponden a Leishmaniasis cutánea sobre todo en zonas donde se invade el hábitat natural de los vectores y en poblaciones de bajos recursos. En este estudio se detectó la presencia de ADN de kinetoplasto por PCR en tiempo real en 252 especímenes pertenecientes a 6 especies de vectores y posibles vectores de leishmaniasis colectados en 3 localidades de la provincia de Esmeraldas y una localidad de Manabí para entender la dinámica de transmisión de la enfermedad. Se encontró una tasa de infección de 3,25% para *Endotrypanum* en *Ps. panamensis* y *Ny. trapidoi* ambas especies consideradas vectores de leishmaniasis.

**Palabras clave:** *Leishmania*, Phlebotominae, ADNk, Leishmaniasis, Trypanosomatidae

## ABSTRACT

*Leishmania* is a protozoan hemoflagellate belong to the Kinetoplastida order and Trypanosomatidae family transmitted to the human through the bite of a female sandfly of the Phlebotominae subfamily. The amastigotes introduced into the skin are responsible for the cutaneous, mucocutaneous or visceral lesions characteristic of the zoonotic disease called leishmaniasis. In Ecuador, leishmaniasis is present in 22 of the 24 provinces. Most of the reported cases are cutaneous Leishmaniasis, especially in areas where the natural habitat of the vectors is invading and in low-income populations. In this study, we detected the presence of kinetoplast DNA by real-time PCR in 252 specimens belonging to 6 species of vectors and possible vectors of leishmaniasis collected in 3 localities of the province of Esmeraldas and one locality of Manabi in order to understand the dynamics of transmission of this disease. An infection rate of 3.25% for *Endotrypanum* was found in *Ps. panamensis* and *Ny.trapidoi* both species considered vectors of leishmaniasis.

**Key words:** *Leishmania*, Phlebotominae, ADNk, Leishmaniasis, Trypanosomatidae

## TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido .....	8
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
1.1 Leishmaniasis en el Ecuador .....	11
1.2 Parásito, vectores y reservorios .....	12
1.3 Detección molecular de Leishmania en flebótomos.....	14
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>15</b>
<b>4. ÁREA DE ESTUDIO .....</b>	<b>16</b>
<b>5. MATERIALES .....</b>	<b>17</b>
5.1 Separación de especímenes.....	18
5.2 Montaje e Identificación de especímenes.....	18
5.3 Extracción de ADN .....	18
5.4 Detección de ADNk por RTPCR .....	19
5.5 Amplificación de ADNk y HSP 70 por PCR convencional.....	19
5.6 Electroforesis en gel de agarosa.....	20
5.7 Secuenciamiento y análisis de secuencias.....	20
<b>6. MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
6.1 Colección entomológica .....	21
6.1.1 Selección de especímenes.....	21
6.1.2 Montaje de especímenes en placa.....	21
6.2 Análisis molecular de los especímenes .....	22
6.2.1 Extracción de ADN .....	22
6.2.2 Detección de ADNk por RT-PCR.....	23
6.2.3 Amplificación de ADNk con PCR convencional .....	23
6.2.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	24
6.2.5 Secuenciamiento y análisis de secuencias.....	24
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
7.1 Colección entomológica .....	25
7.2 Análisis molecular .....	26
7.2.1 Detección de ADNk. por PCR en tiempo real.....	26
7.2.2 Detección de ADNk y HSP 70 por PCR convencional .....	26
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>27</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>35</b>
<b>11. Tablas.....</b>	<b>39</b>
<b>12. Figuras.....</b>	<b>43</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Vectores y posibles vectores asociados a las especies de Leishmania presentes en Ecuador.....	39
Tabla 2. Colección entomológica de especímenes capturados en Junín, Manabí .....	39
Tabla 3. Colección entomológica de especímenes en el Valle del Chocó, Esmeraldas .....	40
Tabla 4. Colección entomológica de especímenes de La Tablada, Esmeraldas .....	40
Tabla 5. Colección entomológica de especímenes de Onzole, Esmeraldas.....	41
Tabla 6. Resultados de PCR convencional con primers Jw11-12 y Heat Shock Protein para determinar presencia de Leishmania en cuatro zonas endémicas de la costa ecuatoriana	41
Tabla 7. Distribución de casos notificados de Leishmaniasis por provincias del Ecuador del 2001-2014.....	42
Tabla 8. Atenciones de morbilidad brindadas a pacientes por zona, provincia, cantón, ministerio de salud pública 2015.....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de las zonas de recolección de Phlebotominae.....	43
Figura 2. Porcentaje de especies encontradas según la zona de colección .....	43
Figura 3. Variación de la abundancia de las especies de <i>Lutzomyia</i> según la precipitación en cada mes del año. ....	44
Figura 4. Variación de la abundancia de las especies de <i>Lutzomyia</i> según la temperatura en cada mes del año. ....	44
Figura 5. Árbol filogenético de la familia Tripanosomatidae en donde se observa la relación entre <i>Leishmania</i> y <i>Endotrypanum</i> .....	45
Figura 6. Curva de Melting obtenida a partir del análisis de muestras con primers de ADNk por medio de Real Time PCR para determinar los pooles positivos.....	45
Figura 7. Amplificación de ADNk (120 pb) en muestras de ADN de especies de la familia Phlebotominae.....	46
Figura 8. Amplificación de HSP70 (1422 pb) en muestras de ADN de especies de la familia Phlebotominae.....	46

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Leishmaniasis en el Ecuador

La Leishmaniasis es calificada por la Organización Mundial de la salud en categoría I por ser una enfermedad infecciosa con carácter emergente e incontrolable. Esta es una de las enfermedades desatendidas en todo el mundo y afecta sobre todo a la población más pobre en los países en vías de desarrollo. La leishmaniasis se puede manifestar de tres formas clínicas: visceral, cutánea y mucocutánea (Montalvo, 2011). La leishmaniasis visceral afecta a varios órganos de forma sistemática como el bazo, la mucosa del intestino delgado, el hígado, los ganglios linfáticos y la medula ósea. La forma asintomática de esta suele ser la más común, pero en otras personas la enfermedad se manifiesta clínicamente e incluso suele ser crónica y afecta generalmente a los niños con malnutrición y personas inmunodeprimidas. Los síntomas suelen ser fiebre, escalofríos, anorexia, molestias en el hipocondrio izquierdo y esplenomegalia (OMS, 2010). La leishmaniasis cutánea se caracteriza por comenzar por una lesión puntual en donde el parásito no migra. Con el tiempo crece lentamente hasta alcanzar su tamaño final produciendo una úlcera luego de una semana y muchas veces se producen también nódulos satélites. La lesión causada dependerá de la especie de *Leishmania* que produjo la infección, sin embargo, es común que se curen luego de varios meses dejando cicatrices desfigurantes o discapacitantes (OMS, 2010; Montalvo 2011). Una variante de esta es la leishmaniasis cutánea difusa en la cual el parásito se extiende localmente y provoca distorsión en los orificios nasales y labios. Por otro lado, otra forma de leishmaniasis es la mucocutánea que produce lesiones en la boca y fosas nasales (OMS, 2010). La mayor parte de casos reportados en Ecuador son de leishmaniasis cutánea (Kato, 2016).

La leishmaniasis es una enfermedad endémica en 18 países del continente americano registrándose hasta el 2014 un promedio anual de 51 779 casos de los cuales en Ecuador en ese mismo año se reportó 1175 casos. No obstante, en los años siguientes el WHO señala que hay falta de información sobre los casos reportados en el Ecuador lo que demuestra la negligencia en el país frente a esta enfermedad y justifica la dificultad de erradicarla. No obstante, en países vecinos como Colombia en el 2014 se reportó una incidencia de leishmaniasis cutánea de 4.02 con un riesgo de 60 % de infección en la población y en Perú una incidencia de 2.7 con un riesgo de infección de 76% (WHO, 2016). El primer caso reportado en Ecuador de leishmaniasis cutánea fue en 1920 en la provincia de Esmeraldas en la zona fronteriza con Colombia (Hasinguchi et al., 2017). En Ecuador está presente en 22 de las 24 provincias del país (Hasinguchi et al., 2017, Calvopiña et al.2004). Los principales factores de riesgo que dan origen a la transmisión del parásito está asociado por un lado a las malas condiciones de vida, a la pobreza, a la falta de saneamiento en los domicilios por ausencia de sistemas de gestión de residuos o falta de alcantarillado puesto que esto puede promover el desarrollo de los lugares de cría de flebótomos y su contacto con la población (Maroli et al.,2012). De igual forma, la exposición por el trabajo a zonas boscosas y la deforestación propicia el contacto con el vector y por ende los casos de transmisión aumentan, así como el cambio de temperatura que hace que el vector infectado se desplace de su hábitat y llegue a zonas donde no era endémico (Maroli et al.,2012).

## **1.2 Parásito, vectores y reservorios**

La *Leishmania*, es un protozooario hemoflagelado del orden Kinetoplastida y de la familia Trypanosomatidae. Por un lado, la forma amastigota se lo encuentra en los vertebrados dentro de macrófagos o células del retículo endotelial (Kato et al., 2010). Por otro lado, la forma de

promastigota se encuentra en el intestino del vector y se caracteriza por poseer un flagelo que le permite la movilidad y flexibilidad (Hasinguchi et al., 2001). El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros, *Leishmania* que se caracteriza por su desarrollo en el intestino medio anterior del vector y *Viannia* que se desarrolla en el intestino medio posterior del vector (Hasinguchi et al., 2001).

La presencia del parásito está asociado a las zonas estudiadas. Manabí se encuentra al oeste de Ecuador en la costa ecuatoriana y presenta un clima que oscila entre subtropical seco a tropical húmedo (Zambrano, 2013). En esta zona, la época entre diciembre a mayo es calurosa por la influencia de la corriente cálida del niño y entre junio a diciembre es menos caluroso porque tienen la influencia de la corriente fría de Humboldt (Zambrano, 2013). Esmeraldas se encuentra en el límite norte con Manabí a una elevación de máximo 600 metros sobre el nivel del mar. El clima varía desde subtropical húmedo hasta subtropical muy húmedo. Se ha reportado hasta ahora en Esmeraldas 3587 casos y en Manabí 2715 casos (Hashiguchi et al., 2017, Kato et al. 2016). Estas zonas se caracterizan por ser áreas rurales en donde el sistema de transporte y médico son deficientes y sobre todo no existe información exacta reportada sobre el verdadero número de casos. En Manabí se ha detectado la presencia de *L. panamensis* y *L. braziliensis* en cuanto que en Esmeraldas siendo más húmedo se ha detectado *L.guyanensis*, *L. amazonensis*, *L.braziliensis*, *L.panamensis*, *L.mexicana* y *L. major-like* (Hashiguchi et al., 2017).

El vector conocido comúnmente como “La Manta Blanca” o flebótomo mide entre 1.5 y 2 mm, tiene alas en forma de V y su color varía entre amarillo pálido y gris (Salomón, 2009). Se ha determinado que existen cinco géneros de flebótomos principales que son los siguientes: *Sergentomyia*, *Warileya*, *Brumptomyia*, *Phlebotomus*, *Lutzomyia*. Únicamente los dos últimos son considerados vectores de *Leishmania*. En Europa, África y Asia se encuentra el género *Phlebotomus* y en América, el género *Lutzomyia* (Hasinguchi et al., 2001, Beati et.al, 2003).

En el Ecuador se ha podido identificar a *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia hartmanni*, *Lutzomyia ayacuchensis*, *Nyssomyia trapidoi* como vectores de Leishmaniasis situadas en diferentes zonas del país (Tabla 1) (Zapata et al., 2012, Hashigushi et al., 2016, Gomez et al., 2014).

El reservorio es una especie huésped que aloja el parásito. Este puede ser un reservorio principal, huésped necesario para mantener el ciclo de vida del parásito, o un reservorio menor, que pueden ser mamíferos que no ayudan en absoluto a mantener el sistema ecológico del parásito (Roque & Jansen, 2014). En Ecuador se han identificado como reservorios principalmente a ciertos mamíferos como *Sciurus vulgaris* (ardilla roja), *Tamandua tetradactyla* (oso hormiguero), *Potos flavus* (Kinkajú) y *Choloepus didactylus* (perezoso) (Roque & Jansen, 2014, Valderrama, 2012)

### **1.3 Detección molecular de Leishmania en flebótomos**

La detección molecular del parásito en flebótomos se basa en la utilización de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La ventaja de esta técnica es que la cantidad de material genético de inicio utilizado en la reacción es mínima por lo que el ADN restante puede ser almacenado y utilizados en otros análisis posteriores. En los primeros estudios realizados para la detección de *Leishmania sp* se utilizaban marcadores proteicos para realizar análisis por medio de RFLPs, RAPDS, microsatélites y SSCP-PCR (García, et al. 2004). Sin embargo, en la actualidad se utilizan marcadores como ITS, COI, cyt b así como también ADN de kinetoplasto (ADNk) y el gen que codifica para la proteína de choque térmico (HSP70).

El ADN de kinetoplasto representa el 20% del ADN del parásito que se compone de moléculas circulares, maxicírculos y minicírculos (Kato et al. 2005). El marcador utilizado por lo general es una secuencia conservada de los minicírculos de kinetoplasto de la familia Trypanosomatidae (JW 11-12) resultando ser una diana genética sensible para detección del

parásito (Nicolas et al., 2002). Por otro lado, se ha evidenciado que el gen de la proteína de choque térmico está presente en *Leishmania* para que este se adapte y sobreviva al cambio de temperatura que sufre cuando se transmite del insecto vector con temperatura alrededor de 22-28°C al hospedero mamífero con temperatura de 31-37°C (Montalvo, 2011).

En este estudio se realizó una detección de ADNk por medio de PCR a tiempo real en 6 especies de flebótomos recolectados de dos provincias de la costa ecuatoriana en donde se ha observado que se reporta un número significativo de casos de leishmaniasis.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica que tiene varios componentes para su transmisión: vector, parásito y reservorios. Es considerada una enfermedad olvidada debido a que afecta principalmente a poblaciones desprotegidas con bajo ingreso económico. En el Ecuador el ministerio de la salud ha reportado 21 305 casos de leishmaniasis hasta el año 2014 (MSP, 2014, Hashiguchi, 2017) y una incidencia significativa de aproximadamente 1650 casos por año lo que evidencia que la enfermedad ha sido hasta ahora descuidada y mal controlada (Hashiguchi, 2017). De acuerdo, con los reportes del 2016 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estimó que la costa ecuatoriana tiene un 50 a 75% de riesgo a contraer leishmaniasis (Paho, 2015) debido a las actividades humanas y el contacto con el vector de la enfermedad. Es por esto que se requieren estudios para entender la dinámica de transmisión de la leishmaniasis en sitios endémicos que permitan evaluar el riesgo en el que se encuentra la población, predecir posibles brotes y poder tomar así las medidas de control necesarias. La detección molecular de flebótomos infectados con ADN de kinetoplasto es importante para evaluar la transmisión de *Leishmania* y la identificación de posibles nuevas especies de vectores presentes en zonas endémicas de leishmaniasis tegumentaria.

## 3. OBJETIVO

### 3.1 Objetivo General

Determinar la presencia de ADN de kinetoplasto (ADNk) de *Leishmania* en 5 especies de flebótomos colectados en cuatro localidades de 2 provincias de la costa ecuatoriana.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Separar flebótomos del resto de insectos capturados de las colectas entomológicas realizadas en las 4 localidades.
- Seleccionar a las subtribus Psychodopygina y Lutzomyiina con la ayuda de la clasificación de Galati (2010).
- Identificar a nivel de especie los especímenes seleccionados a través del uso de claves taxonómicas (Galati, 2010; Young&Duncan, 1994)
- Identificar la presencia de ADN de tripanosomatidae mediante la amplificación de una región conservada de los minicírculos del ADN de kinetoplasto (120pb)
- Identificar la especie de *Leishmania* mediante la amplificación de un segmento del gen HSP70.
- Determinar la tasa de infección de ADNk en las zonas de estudio.

## 4. ÁREA DE ESTUDIO

Los especímenes que provenientes de Junín en la Provincia de Manabí, La Tablada (Atacames) y Onzole (Eloy Alfaro) de la Provincia de Esmeraldas fueron colectadas entre febrero y marzo del 2013. Los especímenes del valle del Chocó de la Provincia de Esmeraldas, colectados en septiembre del 2014, fueron donados por la Universidad Tecnológica Indoamérica.



La Provincia de Manabí se encuentra al oeste del Ecuador en la costa ecuatoriana y presenta un clima que oscila entre subtropical seco a tropical húmedo. La temporada entre diciembre a mayo es calurosa por la influencia de la corriente cálida del Niño y en junio a diciembre es un clima más templado por la influencia de la corriente fría de Humboldt. Hasta el momento se han reportado 2715 casos de Leishmaniasis y se ha detectado la presencia de *Leishmania panamensis* y *L. braziliensis* (Hashiguchi et al., 2017). Junín está ubicado al norte del cantón Portoviejo, al sur de los cantones Tosagua y Bolívar, al oeste del cantón Bolívar, se ubica entre bosque primario y secundario con clima subtropical seco. La deforestación en esta zona es muy alta y solo el 21.3% del territorio está destinado a monte y bosques. Este fenómeno expone a la población a tener mayor contacto con vectores que han sido desalojados de su hábitat natural. La estación lluviosa es de enero a abril y la colecta fue realizada en bosque secundario en marzo del 2013 a 165 msnm.

En la Provincia de Esmeraldas el clima oscila desde subtropical húmedo a subtropical muy húmedo. Hasta ahora se han reportado 3587 casos de Leishmaniasis que han sido producidos por *L.guyanensis*, *L. amazonensis*, *L.braziliensis*, *L.panamensis*, *L.mexicana* y *L. major-like* (Hashiguchi et al., 2017). La primera zona de colección fue La Tablada que se encuentra en el cantón Atacames es un bosque secundario tropical húmedo a 150 msnm. Otra zona de colección fue Santo Domingo de Onzole ubicado en el cantón Eloy Alfaro en el bosque secundario tropical húmedo a 220 msnm. La tercera zona de colecta fue en el valle del Chocó fronterizo con Colombia el cual es un bosque húmedo tropical montano con gran diversidad de animales y plantas. Esta es una de las zonas más conservadas, pero en la actualidad se ve atacado por actividades de deforestación.

## 5. MATERIALES

## **5.1 Separación de especímenes**

- Estéreo microscopio (LEICA EZ4)
- Pinzas entomológicas
- Tubos falcon (Corning Centristar)
- Microtubos de propileno translúcido con tapa rosca (TrueNorth)
- Algodón

## **5.2 Montaje e Identificación de especímenes**

- Microscopio óptico (LEICA DME)
- Estéreo microscopio (LEICA EZ4)
- Alcohol al 70%
- Pipetas Pasteur
- Pinzas entomológicas
- Marc André (40% de Hidrato de Cloral y 30% ácido acético)
- Goma cloral (30% Hidrato de Cloral, 13% Glicerina y 20% Goma Arábiga)
- Portaobjetos biselados (GoldLab)
- Cubreobjetos circulares
- Jeringas de 1ml
- Agujas hipodérmicas (NIPRO 13 x 3; 0.3mm x 13mm)
- Tupos eppendorf 1,5 ml estériles

## **5.3 Extracción de ADN**

- Chellex-100 (Biorad)

- Pistilo plástico
- Proteínasa K RNA grade (Ambion)
- Microcentrífuga Eppendorf ®
- Vortex
- Baño María Shel LAB ®
- Micropipetas (Labnet)
- Tubos eppendorf 1,5ml

#### **5.4 Detección de ADNk por RTPCR**

- Termociclador CFX96 (BioRad)
- Guantes de nitrilo
- Micropipetas y puntas
- QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix (Biorad)
- Tubos Axygen 8-Strip, 0,2 ml y PCR Strip caps (Axygen)
- Primer JW11 (50uM): 5'-CCT ATT TTA CAC CAA CCC CCA GT -3'
- Primer JW12 (50uM): 5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA -3'
- Agua ultrapura

#### **5.5 Amplificación de ADNk y HSP 70 por PCR convencional**

- Puntas con filtro 0.5-10 µl ( Axygen )
- Puntas con filtro 2- 20 µl ( Axygen )
- Puntas con filtro 20-200 µl ( Axygen )
- Puntas con filtro 100-1000 µl ( Axygen )
- Micropipetas (Labnet)

- Tubos eppendorf 0.2ml tapa plana ( Axigen )
- GoTaq (R) Flexi DNA Polymerase, 500U ( Promega )
- dNTP, 10mM, 1000  $\mu$ l ( Promega )
- MgCl<sub>2</sub>, 25mM, 1.5ml (Promega)
- Agua ultrapura
- Tubos eppendorf 1.5ml (ThermoScientific)
- Guantes ( UltraCruz)
- Primer JW11 (50uM): 5'-CCT ATT TTA CAC CAA CCC CCA GT -3'
- Primer JW12 (50uM): 5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA -3'
- Primer HSP 70 senKS (50uM): 5'-GAC GGT GCC KGC STA CTT CAA-3'
- Primer HSP 70 ant (50uM): 5'-CCG CCC ATG CTC TGG TAC ATC-3'

## 5.6 Electroforesis en gel de agarosa

- TBE 1X (Ácido bórico 0,45 M, TRIS Base 0,45 M, EDTA 0,01 M, pH 8)
- Cámara de electroforesis horizontal
- Agarosa LE
- Bromuro de etidio (SIGMA)
- Micropipetas (Labnet)
- Orange Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Balanza analítica (ADAM AQT-600)
- Microondas
- Erlenmeyer de 500 ml

## 5.7 Secuenciamiento y análisis de secuencias

- Amplicones Jw11-12
- Amplicones HSP
- Software: PRE GAP, GAP, BIOEDIT

## **6. MÉTODOS**

### **6.1 Colección entomológica**

#### **6.1.1 Selección de especímenes**

Los especímenes fueron colectados en cuatro localidades. En el año 2013 en Manabí (Junín), en Esmeraldas (Onzole y La Tablada) y en el 2014 en Esmeraldas (Valle del Chocó). Los especímenes se encontraban en envases plásticos conservados en alcohol al 70%. En el Laboratorio de Parasitología de la Universidad San Francisco de Quito se separó los especímenes pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae diferenciando machos y hembras en base a criterios morfológicos con ayuda de un estereomicroscopio y pinzas entomológicas. Se seleccionó las especies que son parte de las subtribus Psychodopigina y Lutzomyiina puesto que dentro de estos están la mayoría de especies vectoras. Luego se los almacenó en microtubos con alcohol al 70% a -20°C.

#### **6.1.2 Montaje de especímenes en placa**

Con ayuda de una pipeta pasteur se extrajo individualmente cada espécimen y se lo colocó en un portaobjetos bajo el estereomicroscopio. Se colocó 2 gotas de alcohol al 70% sobre el espécimen para evitar que se deshidrate. Luego se realizó la disección con ayuda de 2 agujas hipodérmicas estériles cortando los tres últimos segmentos del abdomen, la cabeza y las alas. El tórax y extremidades fueron depositados en un tubo eppendorf estéril de 1,5 ml que se almacenó a -20°C para posterior extracción de ADN. Luego se colocó una gota de goma cloral

en la esquina derecha superior de la placa y se tomó el ala con la aguja hipodérmica para situarla en la goma de tal forma que esté bien estirada. La cabeza y abdomen fueron tratadas con 1 gota de la solución de Marc André y se esperó unos segundos con el fin de que los tejidos se aclararan. Luego se colocaron en la goma cloral teniendo en cuenta que los ojos estén hacia abajo y las antenas hacia el lado contrario del observador. Una vez que todas las estructuras de interés estén sumergidas en la goma se colocó un cubreobjetos redondo para fijar las estructuras y se presionó suavemente para eliminar el aire.

La identificación de los especímenes fue realizada con el apoyo de claves taxonómicas de Galati (2010) y Young (1994). Los criterios morfológicos utilizados fueron: la estructura del cibario, forma de la espermateca y relación palpar.

## **6.2 Análisis molecular de los especímenes**

### **6.2.1 Extracción de ADN**

Se extrajo ADN de 5 especies consideradas como vectores o posibles vectores. La extracción de ADN fue realizada con Chellex al 10%. En un tubo falcon se mezcló 1g de Chellex con 9 ml de agua destilada estéril y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En el primer paso de la extracción se agregó 100  $\mu\text{l}$  de chellex al tubo eppendorf de 1,5 ml donde se encontraba el cuerpo del espécimen y se lo trituró con un pistilo hasta que no se pueda observar partículas visibles del espécimen. Se colocó en el vortex por 2 minutos y se centrifugó a 5000 rpm por 15 segundos. Luego se añadió 5  $\mu\text{l}$  de proteinasa K y se incubó en baño maría a  $56^{\circ}\text{C}$  durante una hora. Una vez que se cumplió este tiempo se colocó en el vortex una vez más y se incubó esta vez a  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Finalmente, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **6.2.2 Detección de ADNk por RT-PCR**

La amplificación en tiempo real se realizó en pools de ADN de 3 especímenes de la misma especie. Para la reacción se utilizó los primers JW11 (50uM): 5'-CCT ATT TTA CAC CAA CCC CCA GT -3' y JW12 (50uM): 5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA -3' y Evagreen para producir la fluorescencia que será detectada en los pools positivos. El protocolo utilizado fue el siguiente: Denaturación inicial a 95°C por 3 minutos seguido de Denaturación a 95°C por 10 min. Luego se realiza el annealing a 56°C por 10 segundos seguido de una extensión a 72°C de 8 segundos. El equipo realizó una primera lectura y volvió al paso 2 por 39 ciclos consecutivos. Luego se denaturó una vez más a 95°C por 10 segundos y fue seguido de un annealing a 67°C por 31 segundos. Luego se realizó annealing a 67°C disminuyendo en cada ciclo 0.5°C. El equipo realizó una nueva lectura y volvió al paso 9 por 56 ciclos más. La etapa final fue a 40°C por 1 minuto.

### **6.2.3 Amplificación de ADNk con PCR convencional**

Se realizó la amplificación de ADNk por medio de PCR convencional en las muestras que correspondían a los pools positivos obtenidos en el RT-PCR. Los primers utilizados fueron los mismos y el tamaño de fragmento esperado fue de 120 pb. Se utilizó 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 Mm dNTPs, 0.75 mM Primer JW 11 y 0.75 mM Primer JW-12 y agua ultrapura. Se cargó 1 µl de ADN por muestra para llegar a un volumen de reacción de 10 µl.

El protocolo utilizado en el termociclador fue el siguiente: Denaturación inicial a 94°C por 3 minutos y posterior denaturación a 94°C por 1 minuto. Luego annealing a 59°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos para luego volver al paso dos y realizar 29 ciclos. Finalmente se realiza una extensión final a 72°C por 10 minutos.

También se realizó la amplificación de HSP70 por medio de PCR convencional en las muestras que fueron positivas para la amplificación de ADNk. Los primers utilizados fueron los siguientes: Hsp70 positivo: GACGGTGCCTGCCTACTTCAA y HSP70 negativo: CCGCCCATGCTCTGGTACATC (Montalvo, 2011)

El tamaño de fragmento esperado fue de 1422 pb. Se utilizó 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 2mM de dNTPs, 0,025 U de Taq, 0,4 µl de Primer HSP, Buffer 1X y agua ultrapura. Se utilizó 2 µl de ADN por muestra para llegar a un volumen de reacción de 10 µl.

El protocolo utilizado en el termociclador fue el siguiente: Denaturación inicial a 95°C durante 15 minutos seguido por una denaturación a 94°C por 30 segundos. Luego annealing a 60 °C por 60 segundos, extensión a 72°C por 60 y vuelve al paso 2 de denaturación por 45 ciclos. Finalmente, extensión final a 72°C por 6 segundos.

#### **6.2.4 Electroforesis en gel de agarosa**

La visualización de la amplificación con los distintos marcadores se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Para lo cual se pesó 1.5 g de agarosa y se colocó en un Erlenmeyer con 100 ml de TBE 1X. Se disolvió el gel por 2 minutos en el microondas y se dejó enfriar hasta que la temperatura del Erlenmeyer sea tolerable al tacto. Se agregó 1,5 µl de bromuro de etidio 1/100 y se homogenizó bien. Luego se armó la cámara de electroforesis se colocó el peine y luego se vertió el gel en el molde y se esperó que se solidifique durante 20 minutos. Una vez que el gel solidificó se retiró el peine y se colocó la solución TBE 1X sobre el gel de tal forma que lo cubra por completo. Se colocó en el primer pocillo estándar de tamaño (100 pb) y en los demás se colocaron las muestras. Las condiciones de corrida fueron a 80 V, 200 mA por 60 minutos.

#### **6.2.5 Secuenciamiento y análisis de secuencias**



Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar Funtional BioSciences. Los resultados del secuenciamiento fueron procesados mediante el paquete estadístico Staden (GAP y PREGAP) y el análisis de secuencias se realizó con el programa Bioedit y MEGA 4.0.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Colección entomológica

Se realizó el montaje en placa de 300 especímenes (Figura 1) provenientes de Esmeraldas y Manabí. De los cuales el 30% de especímenes procesados fue de Junín de la Provincia de Manabí. En la Provincia de Esmeraldas, el 42.3% de especímenes procesados fueron del Valle del Chocó, el 1.67% corresponde a la Tablada y 26% a Onzole.

En Manabí se identificó 7 especies: *Psychodopygus panamensis*, *Nyssomyia trapidoi*, *Psychodopygus carrerai thula*, *Lutzomyia hartmanni*, *Lutzomyia gomezi*, *Sciopemyia sordelli* y *Pressatia dysponeta*. Siendo *Psychodopygus panamensis* la especie más frecuente.

Por otro lado, en la provincia de Esmeraldas en La Tablada se identificó 5 especies: *Ps. panamensis*, *Ny. trapidoi*, *Ps. carrerai thula*, *Lu. hartmanni*, *Pressatia dysponeta* y en Onzole se encontró 3 especies: *Ps. panamensis*, *Ps. carrerai thula* y *Pressatia dysponeta* (Tabla 1). En estas dos localidades, al igual que en Manabí, se observó una presencia mayor de *Psychodopygus panamensis*. En el Valle del Chocó (Esmeraldas) se encontró una mayor diversidad que en las otras zonas de colección puesto que se observó 17 especies diferentes: *Ps. panamensis*, *Ny. trapidoi*, *Ps. carrerai thula*, *Lu. hartmanni*, *Pi. serrana*, *Trychophoromyia reburra*, *Lu. renei*, *Lu. sanguinaria*, *Psathyromyia shannoni*, *Sciopemyia sordelli*, *Mycropygomyia trinidadensis*, *Psathyromyia aclydifera*, *Ny. bibinae*, *Lu. bifoliata*, *Lu. gomezi* y *Pressatia dysponeta*. A diferencia de las otras localidades analizadas se encontró una mayor

presencia de *Nyssomyia trapedoi*. Adicionalmente, en todas las localidades estuvo presente *Pressatia dysponeta*.

## **7.2 Análisis molecular**

### **7.2.1 Detección de ADNk. por PCR en tiempo real**

Se procesó un total de 279 especímenes distribuidos en 93 pools de los cuales 28 fueron de Manabí, 41 del Valle del Chocó, 1 de La Tablada y 23 en Santo Domingo de Onzole como se detalla en la *Tabla 5*.

En Manabí 4 pools de *Psychodopygus panamensis* fueron positivos y para el Valle del Chocó 3 pools positivos de *Ny. trapedoi*. Se utilizó como controles negativos 5 machos de los cuales 2 eran *Ny. trapedoi* y 3 eran *Ps. panamensis*.

### **7.2.2 Detección de ADNk y HSP 70 por PCR convencional**

Se analizaron 21 especímenes provenientes de los 7 pools positivos. y se obtuvo 8 muestras positivas, de las cuales 5 eran de Manabí y 3 eran del Valle del Chocó. De estas 8 muestras positivas obtenidas ninguna amplificó para el gen HSP70 de *Leishmania*. Los resultados del secuenciamiento indican que todas las muestras pertenecen al género *Endotrypanum* (figura 5). La prevalencia de *Endotrypanum* en las muestras analizadas fue de 3,2%. Al analizar la prevalencia por localidad se obtuvo 6% en Junín y 3% en el Valle del Chocó. En Junín, se encontró a *Ps. panamensis* infectado con ADN de *Endotrypanum* mientras que el Valle del Chocó a *Ny. trapedoi*.

## 8. DISCUSIÓN

Los resultados de las colectas entomológicas muestran que la zona que presentó más diversidad fue el Valle del Chocó de Provincia de Esmeraldas donde se identificó 17 especies diferentes entre las cuales la más abundante fue *Ny. trapidoi*. El valle del Chocó es una reserva que se caracteriza por ser un bosque húmedo tropical con gran diversidad de animales y plantas. Según la bibliografía la fauna de flebótomos se compone principalmente de *Ps. panamensis*, *Ny. trapidoi*, *Lu.gomezi*, *Lu. sanguinaria*, *Bichromomyia olmeca bicolor* y *Lu. hartmanni* (Vivero et. Al, 2011). En este estudio se encontró 18% de *Ps. panamensis* (Tabla 2) lo que concuerda con el estudio de Vivero et. al (2011) en donde encontró 15,02 %. Sin embargo, se encontró 40% *Ny. trapidoi* a diferencia del estudio ya nombrado en donde se encontró únicamente 0,58% de esta. Esta diferencia en la abundancia encontrada podría deberse a la fecha de colección. Vasquez et al. (2011) en su estudio señala que la diversidad y la actividad estacionaria de las especies de flebótomos en una zona puede ser dependiente de la temperatura, la precipitación de la zona de estudio y la temporada del año en la cual se realizó la colección. En la zona del valle del Chocó la colección fue realizada en el mes de septiembre 2014 que corresponde a la temporada seca y según Calvopiña (2004) en esta época la especie de flebótomos predominante es *Ny. trapidoi* lo que concuerda con los hallazgos de este estudio. Por el contrario, en el estudio de Vivero et. Al (2011) la colección fue realizada en la temporada húmeda por lo que se encontró un porcentaje muy bajo *Ny. trapidoi*.

Adicionalmente, en el Valle del Chocó se encontró en porcentajes muy bajo *Psathyromyia shannoni* (0.8%), *Lu.sanguinaria* (0.8%), *Mycropygomyia trinidadensis* (0,8%) y *Lu. hartmanni* (2,4%) que concuerda con la fauna del Valle del Chocó de Colombia reportada por Ferro et al. (2015).

El Valle del Chocó es la zona más diversa en especies de flebótomos y esto se explica por el hecho de que es una zona que ha sido muy poco explorada y no ha sido modificada por actividad antropogénica.

Por otro lado, los resultados de la colecta de las localidades de la provincia de Esmeraldas muestran menor diversidad pues en Onzole se obtuvo únicamente 3 especies diferentes y en la Tablada solo 4 dentro de las cuales la más abundante fue *Ps. panamensis*. Esto podría explicarse con dos hechos. Por un lado, el número de especímenes tomadas de estas zonas puede que no haya sido suficiente como para que representen la verdadera diversidad o la temporada de colecta pudo haber influenciado en la abundancia de flebótomos obtenidos. En efecto, en estas dos zonas de colección la falta de diversidad de flebótomos y la prevalencia de ciertas especies puede deberse a que la colecta fue realizada en febrero y marzo del 2013, que corresponde a la temporada lluviosa en la costa ecuatoriana. Se ha probado en estudios anteriores que las altas precipitaciones no son un ambiente favorable para la emergencia de ciertas especies flebótomos ya que su mayor recurrencia se observa bajo condiciones de temperaturas elevadas y temporadas secas sobre todo durante mayo a diciembre (Vasquez et al., 2011, figura 3). Un ejemplo de esto es *Ny. trapedoi* que tiene preferencias por las temporadas secas como se mencionó anteriormente.

En lo que respecta a Manabí se encontró 7 especies de las cuales la más abundante fue una vez más *Ps. panamensis*. y se identificaron otras especies como *Lu. hartmanni*, *Ny. trapedoi* y *Lu. gomezi* y *Ps. carrerai thula* esta última con un bajo porcentaje. Sin embargo, dado que posiblemente como la colección fue realizada en temporada lluviosa no se encontró una amplia diversidad en esta zona como en el Chocó. Vasquez (2011) sostiene que *Lu. gomezi* tiene preferencia por las temporadas secas lo que lo que sustenta el hecho de que se encontró únicamente 1% de frecuencia para esta especie. Por otro lado, Vasquez (2011) sostiene que *Ps.*

*panamensis* es una especie que es longeva y tiene la capacidad de adaptarse a diferentes ambientes lo que explicaría su presencia en un porcentaje significativo en todas las zonas de estudio a pesar de que exista altas precipitaciones.

De igual forma, es importante mencionar que en todas las zonas se encontró un porcentaje importante de *Pressatia dysponeta*. En efecto, estudios anteriores reportaron frecuencias de esta especie tales como 38,4% en Manabí y 65,6% en Esmeraldas (Vela, 2014). Se cree que *Pressatia dysponeta* se encuentran frecuentemente en corrales de cerdos y gallineros por lo que su distribución se solapa con la de los flebótomos de interés médico siendo así su presencia inevitable entre los especímenes recolectados.

La temperatura es otro parámetro que se debe considerar. En efecto, la temperatura ambiental es un determinante relacionado principalmente con la actividad nocturna diaria de algunas especies de *Lutzomyia*. En un estudio realizado en Colombia, *Lu. longipalpis* a temperaturas menores a 24°C disminuyó su actividad (Carvajal et al., 2008). Adicionalmente, en el mismo estudio, se encontró que el principal determinante que explica la abundancia estacional de *Pintomyia longiflcosa* fue efectivamente la temperatura (Carvajal et al., 2008). Por su lado, Vasquez et al. (2011) en su estudio de abundancia de flebótomos durante el año concluyó con una gráfica (figura 4) que muestra una mayor abundancia de especies en épocas con temperaturas altas que en épocas con temperaturas bajas.

La humedad también es un parámetro que se debe tomar en cuenta, se ha podido observar que la humedad relativa también afecta a ciertas especies sobre todo en la actividad nocturna de los flebótomos (Vasquez, 2011). En un estudio realizado en Colombia se determinó que *Lu. longipalpis* aumenta su actividad nocturna cuando hay porcentajes de humedad alto superiores al 80%. Incluso se ha constatado que la densidad estacional de *Ps. fartigi* tiene relación con la variación de la humedad relativa durante el año (Molina et al.2008).

Es así como la precipitación, temperatura y humedad relativa podrían ser factores ambientales determinantes de los modelos estacionales del vector, afectando tanto su actividad como su abundancia. Por consiguiente, esto podría ser determinante en la dinámica de transmisión de la enfermedad dado que se ha podido demostrar que el ciclo del vector estaría ligada a la fluctuación de transmisión de *Leishmania*.

Adicionalmente, en base al estudio realizado y estudios realizados anteriormente se observa que las zonas de estudio se definen por una distribución de flebótomos característica que puede deberse a los parámetros mencionados anteriormente pero también existen otros que no han podido ser visualizados en este estudio. Uno de ellos puede ser el hecho de que al ser los flebótomos muy pequeños su rango de vuelo es corto, aproximadamente 300 m, y se ve limitado a estar próximo al lugar de criaderos larvales, frescos, oscuros y húmedos en donde se forman varios microhábitat (Salomón, 2009). De igual forma, el viento a altas velocidades impide el vuelo de los flebótomos por lo que prefieren permanecer en las zonas endémicas a menos que se produzca un cambio climático en la zona que los obligue a emigrar.

En este estudio se encontró una prevalencia del 3,2% de *Endotrypanum* en *Ps. panamensis* y *Ny.trapidoi* y ausencia de ADN de *Leishmania sp* que puede explicarse con el hecho de que la tasa de infección de *Leishmania* es generalmente baja, menor al 1%. Por otro lado, Kato et al. (2016) encontró en 165 pacientes solo 2 infectados con *Leishmania* en Junín y en Atacames, en la provincia de Esmeraldas, 1 infectado de 165 pacientes. Lo que demuestra que se encontró un bajo número de casos que estaría relacionados con la baja incidencia de *Leishmania* en esas temporadas.

Adicionalmente, en el 2013 el Ministerio de la Salud reportó una incidencia del 10.86% en Manabí correspondiente a 28 casos reportados, en Esmeraldas 8.97% que corresponde a 69

casos reportados y en el 2014 en la misma provincia se reportó una incidencia de 5,04% que corresponde a 13 casos (MSP, 2014). El bajo número de casos reportados en esos años podría estar evidenciando una baja tasa de infección de *Leishmania* en la población de vectores en las fechas de colección de este estudio.

De igual forma, Gómez et al (2014) en su estudio encontró 1.09 % de flebótomos infectados con de ADN de *Leishmania*. Esto podría relacionarse con un bajo número de casos de leishmaniasis en Ecuador.

Adicionalmente, según el estudio de Alvar et al. (2012) sobre la estimación global de incidencia de *Leishmania*, el Ecuador se encuentra dentro de los países como menor incidencia de este parásito, por lo tanto, el no haber encontrado flebótomos infectados en este estudio podría ser lógico. Sin embargo, Colombia, uno de los países fronterizos con Ecuador, se encuentra en la lista de los 10 países del mundo con mayor número de casos reportados por lo que no sería raro que en un futuro el número de casos en Ecuador se incremente sobre todo en zonas fronterizas como el Valle del Chocó por lo que este tipo de estudios son importantes y deben realizarse de forma continua.

En este estudio se encontró 3.2 % de infección de ADN de *Endotrypanum* en *Ps. panamensis* de Manabí y *Ny. trapidoi* del Valle del Chocó (figura 5). Este resultado concuerda con otros estudios realizados previamente en el Ecuador en estas zonas en donde se encontró 11.5% y 12.2 % de infección de *Endotrypanum* en *Ny. trapidoi* (Zapata, 2012; Vela, 2014), y 3.9% en *Ny. yuilli yuilli* (Kato et al. 2013)

Otros estudios han reportado a *Ny. trapidoi* infectado con *Endotrypanum* en Manabí, Guayas, Pichincha, Chimborazo, Cotopaxi, Bolivar, Cañar y a *Ps. Panamensis* en Pichincha (Gómez et al, 2014). Adicionalmente, *Endotrypanum* ha sido detectado en otras especies de flebótomos como *Pi. robusta*, *Lu. hartmani*, *Ny. yuilli yuilli* (Gomez et al, 2014)

Se conocen que *Endotrypanum monterogeii* y *Endotrypanum schaudini* están presentes en el Ecuador y es un parásito de perezosos, (Paiva et al., 2006, Brazil 2015). *Endotrypanum monterogeii* infecta naturalmente a *Ny. trapidoi* y *Lu. hartmanni* en 11 provincias del Ecuador Manabí, Los Ríos, Guayas, Pichincha, Bolívar, Imbabura, Cotopaxi, Cañar, Chimborazo, Orellana y Sucumbíos (Kakatura et al. 2003).

*Endotrypanum* y *Leishmania*, son 2 géneros muy relacionados que pertenecen a la familia Trypanosomatidae y muchas veces han sido confundidos puesto que son los géneros más emparentados y en varias zonas su distribución se solapa (Katakura et al., 2003). Un ejemplo de esto fue la descripción de *L(V). equatorensis* que luego fue reclasificada como *Endotrypanum* (Kakatura et al.2003). Los dos géneros son transmitidos por flebótomos, sin embargo, el reservorio de *Endotrypanum* está restringido a los osos perezosos y *Leishmania* infecta todo tipo de mamíferos incluyendo los humanos por lo que es considerada de importancia clínica (Cupolillo et al. 2000). De igual forma, *Endotrypanum* no puede sobrevivir al ataque de los macrófagos a diferencia de *Leishmania* que, mediante mecanismos de supervivencia, como los lipofosfoglicanos en su superficie y el desprendimiento de su flagelo, le permite sobrevivir dentro de los macrófagos en forma de amastigote. Esto explica porque solo el género *Leishmania* se pudo adaptar a infectar a humanos (Cupolillo et al.2000). Por otro lado, se ha demostrado que existe una interacción compleja entre el vector y la *Leishmania* que favorece la transmisión de este último a mamíferos. De igual forma, se ha podido comprobar que la picadura del flebótomo induce a una respuesta aguda inflamatoria únicamente después de tres horas de haber sido infectado con el parásito lo que le da una ventaja para la colonización del hospedero (Bates et. Al, 2015).

Es por esto que utilización de marcadores moleculares es muy importante para hacer la distinción correcta entre estos dos parásitos. Los marcadores moleculares han sido una herramienta muy útil para medir de forma indirecta cambios acumulados en el genoma de



diferentes especies y sobre todo permite la resolución taxonómica de especies conflictivas y de importancia medica como es el caso de *Endotrypanum* y *Leishmania*.

En este estudio se utilizó la técnica de PCR a tiempo real para la detección de ADN de kinetoplasto de la familia Trypanosomatidae. Esta técnica se caracteriza por realizar una detección rápida, sensible que evita falsos positivos y evita el riesgo de contaminación dado que la detección se realiza directamente del tubo (Montalvo, 2011).

Finalmente, se pudo comprobar que las técnicas moleculares son una herramienta poderosa para la investigación de los flebótomos y su interacción con el parásito porque ofrecen información necesaria como la variación estacional definida por la tasa de infección que puede ser tomadas en diferentes períodos y la prevalencia del vector para determinar los factores de riesgo de adquirir leishmaniasis en un área específica.

## 9. CONCLUSIONES

1. La tasa de infección con ADN de *Endotrypanum* fue del 3,2 % en *Ny. trapidoi* y *Ps. panamensis* sin embargo, ninguna especie mostró infección con ADN de *Leishmania*.
2. Se identificó 18 especies de flebótomos en las cuatro zonas de estudio (Onzole, La Tablada, Junín y el Valle del Chocó). Cada zona tiene una abundancia y diversidad de especies características lo que puede ser determinante para que en unas zonas haya mayor número de caso reportados que en otras.
3. Las especies más abundantes fueron *Pressattia dysponeta*, *Psychodopygus panamensis* y *Nyssomyia trapidoi*, esta última es considerado como principal vector leishmaniasis cutánea en el Ecuador.

4. La diversidad y abundancia de ciertas especies podrían estar relacionadas con factores ambientales como la temperatura, precipitación, temporada del año en el que se realiza la colecta y condiciones que ofrece la zona seleccionada.
  
5. En el Valle del Chocó presentó la mayor diversidad de especies debido a que se trata de una zona poco modificada por actividades humanas y de igual forma la temporada de colección fue la más adecuada puesto que los flebótomos prefieren realizar su actividad en temporadas secas y con alta temperatura.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvar, J. et al.(2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 7(5).
- Alves,M. et al. (2009).Principles and applications of polymerase chain. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40.
- Bates, P. et al.(2015).Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. *Parasites & Vectors*, 8(131).
- Beati,L. et al.(2003). Systematic relationships among Lutzomyia sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *International Journal for parasitology*, 34(2).
- Brazil , R. et al.(2015). Sand Fly Vectors of Leishmania in the Americas. *Entomol Ornithol Herpetol*, 4(2).
- Calvopiña,M. et al.(2004). Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador: Current Status of Knowledge. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 99(7).
- Cupolillo, E. et al.(2000). A Revised Classification for Leishmania and Endotrypanum. *Parasitology today*, 16(4).
- Ferro,C. et al.(2015). Spatial Distribution of Sand Fly Vectors and Eco-Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis Transmission in Colombia. *PLoS ONE*, 10(10).
- Galati, E.(2010). Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) Classificação, Morfologia, Terminologia e Identificação de Adultos.. Apostila Disciplina HEP 5752. Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. Departamento de Epidemiología. Facultad de Salud Pública de São Paulo, Brasil Press., Volumen 1.
- García,L. et al.(2004). Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for

- clinical validation of PCR- based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clinical Microbiology*, 42(7).
- Gomez, E. et al. (2014). Man-biting sand fly species and natural infection with the *Leishmania* promastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. *Acta Tropica*, 140.
- Hashiguchi, Y et al.2017. Leishmaniases in Ecuador: Comprehensive review and current status. *Acta Tropica*, 166.pp 299-315.
- Katakura, K et al. (2003). Identification of Endotrypanum Species from a Sloth, a Squirrel and *Lutzomyia* Sandflies in Ecuador by PCR. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65(5).
- Kato et al. (2005).Detection and identification of leishmania species within naturally infected sand flies in the andean areas of ecuador by a polymerase chain reaction. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(1)
- Kato ,H. et al. (2010). Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7.
- Kato,H. et al. (2013). First human cases of *Leishmania (Viannia) naiffi* infection in Ecuador and identification of its suspected vector species. *Acta Tropica*, 128(3).
- Kato,H. et al.(2016). Geographic Distribution of Leishmania Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 10(7).
- Maroli,M. et al. (2012). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 10.
- MSP. 2014. Gaceta epidemiológica semanal. Recuperado de <http://instituciones.msp.gob.ec/images/Documentos/Ministerio/EPIDEMIOLOGIA/gaceta2014/gaceta4.pdf>

Montalvo, M. (2011). Tipificación de especies de *Leishmania* de importancia medica basada en el gen que codifica la proteína HSP 70 citoplasmática. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri.

Nicolas, L. et al. 2002. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. *Journal of clinical microbiology*, 40(5).

OMS.2012. *Control de Las Leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis*, Ginebra. Informe técnico 949.

Paiva,B. et al.(2006).Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured

Paho.(2015).Enfermedades infecciosas desatendidas en la region de las Américas.

Leishmaniasis Tegumentaria 2013 en Ecuador. Recuperado de [http://www.paho.org/hq/images/ATLAS\\_CD/NID\\_Subnational/atlas.html](http://www.paho.org/hq/images/ATLAS_CD/NID_Subnational/atlas.html)

Roque,A. & Jansen, A. (2014).Wild and synanthropic reservoirb of Leshmania species.

Interational Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife.

Salomón, O. (2009). Vectores de leishmaniasis en las américas. *Gazeta Médica da Bahia*, 79(3).

Vasquez,A. (2011). *Variación estacional de la abundancia y la infección con Leishmania spp. en flebótomos de un área rural de Villavicencio, Meta*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia

Vela, G. (2014). Variación genética de *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) en tres

zonas endémicas de leishmaniasis cutánea en el Ecuador. Universidad San Francisco de Quito

Vivero, R. et al. (2011). Fauna de flebotomíneos (diptera: psychodidae) en acandí (chocó, colombia). *Acta Biológica*, 16(1).

WHO. (2016). Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Weekly epidemiological record*, 22(3).

WHO. (2016). Number of cases of cutaneous leishmaniasis reported Data by country.

Recuperado de <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHCNUM?lang=en>

Young, D. & Duncan, M. (1994). *Guide to the identification and geographic distribution of*

*Lutzomyia sand flies in mexico, west indies, central and south america (Diptera:*

*Psychodidae)*. Florida: Memoirs of the american entomological institute.

## 11. TABLAS

Tabla 1. Vectores y posibles vectores asociados a las especies de *Leishmania* presentes en Ecuador.

Vectores	Especies	Zonas	Provincias
<i>Ny. trapidoi</i>	<i>L.(V.) guyanensis</i> , <i>L.(V.) panamensis</i>	Costa y Cordillera de los andes	Manabi, Esmeraldas
<i>Lu. gomezi</i>	<i>L.(V.) guyanensis</i> , <i>L.(V.) panamensis</i>	Costa y Cordillera de los andes	-
<i>Lu. ayacuchensis</i>	<i>L.(L.) mexicana</i>	Valles andinos y Costa	Esmeraldas
<i>Lu. tortura</i>	<i>L.(L.) naiffi</i>	Amazonia	-
N/D	<i>L.(L.) amazonensis</i>	-	Esmeraldas
N/D	<i>L.(L.) major-like</i>	-	Esmeraldas
N/D	<i>L.(V)lainsoni</i>	-	-

\*Vectores o posibles vector encontrados en otras regiones están presentes en el Ecuador : *Lu. hartmanni*, *Bichromomyia flaviscutellata*, *Bichromomyia. olmeca olmeca*, *Lu. olmeca bicolor*, *Ps. panamensis*, *Ps. carrerai carrerai*, *Migonemyia migonei*

N/D: no se ha atribuido a esta especie de *Leishmania* ningún vector

Tabla 2. Colección entomológica de especímenes capturados en Junín, Manabí

Manabí		
Especies	Número	Porcentaje
<i>Psychodopygus panamensis</i>	65	72%
<i>Nyssomyia trapidoi</i>	1	1%
<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	13	14%
<i>Lutzomyia hartmanni</i>	2	2%
<i>Lutzomyia gomezi</i>	1	1%
<i>Sciopemyia sordelli</i>	1	1%
<i>Pressatia dysponeta</i>	7	8%
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>100%</b>

Tabla 3. Colección entomológica de especímenes en el Valle del Chocó, Esmeraldas

<b>Chocó</b>		
<b>Especies</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>
<i>Ps.panamensis</i>	23	18.5%
<i>Ny.trapidoi</i>	65	52.4%
<i>Ps.carrerae thula</i>	4	3.2%
<i>Lu.hartmanni</i>	3	2.4%
<i>Pintomyia serrana</i>	2	1.6%
<i>Trychophoromyia reburra</i>	6	4.8%
<i>Lu.renei</i>	1	0.8%
<i>Lu.sanguinaria</i>	1	0.8%
<i>Psathyromyia shannoni</i>	1	0.8%
<i>Sciopemyia sordelli</i>	3	2.4%
<i>Mycropygomyia trinidadensis</i>	1	0.8%
<i>Psathyromyia aclydifera</i>	1	0.8%
<i>Ny.bibinae</i>	1	0.8%
<i>Lu.bifoliata</i>	2	1.6%
<i>Lu.gomezi</i>	1	0.8%
<i>Pressatia dysponeta</i>	6	4.8%
<b>Total</b>	<b>124</b>	<b>100%</b>

Tabla 4. Colección entomológica de especímenes de La Tablada, Esmeraldas

<b>La Tablada</b>		
<b>Especies</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>
<i>Ps.panamensis</i>	2	40%
<i>Ny.trapidoi</i>	1	20%
<i>Lu.hartmanni</i>	1	20%
<i>Pressatia dysponeta</i>	1	20%
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>100%</b>



Tabla 5. Colección entomológica de especímenes de Onzole, Esmeraldas

<b>Onzole</b>		
<b>Especies</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>
<i>Ps.panamensis</i>	62	79%
<i>Ps. carrerai thula</i>	6	8%
<i>Pressatia dysponeta</i>	10	13%
<b>Total</b>	<b>78</b>	<b>100%</b>

Tabla 6. Resultados de PCR convencional con primers Jw11-12 y Heat Shock Protein para determinar presencia de *Leishmania* en cuatro zonas endémicas de la costa ecuatoriana

<i>Especie</i>	<i>Localidad</i>	<i>Provincia</i>	<i>Numero de especímenes</i>	<i>ADNk</i>	<i>HSP70</i>
<i>Ps.panamensis</i>	Junín	Manabí	65	5	0
	Valle del Chocó	Esmeraldas	23	0	-
	Onzole	Esmeraldas	62	0	-
	La Tablada	Esmeraldas	2	0	-
<i>Ny.trapidoi</i>	Junín	Manabí	1	0	-
	Valle del Chocó	Esmeraldas	65	3	0
	La Tablada	Esmeraldas	1	0	-
<i>Ps.carrerai thula</i>	Junín	Manabí	13	0	-
	Valle del Chocó	Esmeraldas	4	0	-
	Onzole	Esmeraldas	6	0	-
<i>Lu.hartmanni</i>	Junín	Manabí	2	0	-
	Valle del Chocó	Esmeraldas	3	0	-
	La Tablada	Esmeraldas	1	0	-
<i>Lu.gomezi</i>	Junín	Manabí	1	0	-
	Valle del Chocó	Esmeraldas	1	0	-
<i>Pi. serrana</i>	Valle del Chocó	Esmeraldas	2	0	-
Total			252	8	0

Tabla 7. Distribución de casos notificados de Leishmaniasis por provincias del Ecuador del 2001-2014

Provinces	Years														Total
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	
<b>Coastal regions (COSTA)</b>															
Esmeraldas	429	276	265	692	446	217	125	241	225	127	122	207	79	136	3587
Manabi	504	125	402	585	350	96	81	120	220	101	55	59	1	16	2715
Los Rios	39	41	35	66	59	55	63	78	33	110	35	47	55	26	742
Guayas	30	26	26	49	26	72	23	13	27	17	9	3	1	27	349
Sta.Elena**									0	0	1	0	5	0	6
El Oro	8	12	22	23	5	9	11	19	40	23	13	6	11	30	232

(Hashiguchi et al., 2017)

Tabla 8. Atenciones de morbilidad brindadas a pacientes por provincia, cantón, Ministerio de Salud Pública 2015.

Provincia	Canton	Causa	Número de Casos 2015
Esmeraldas	Atacames	Leishmaniasis cutanea	40
Esmeraldas	Eloy Alfaro	Leishmaniasis cutanea	4
Manabi	Junin	Leishmaniasis cutanea	2

(Información proporcionada por el Ministerio de la Salud Publica)

## 12. FIGURAS

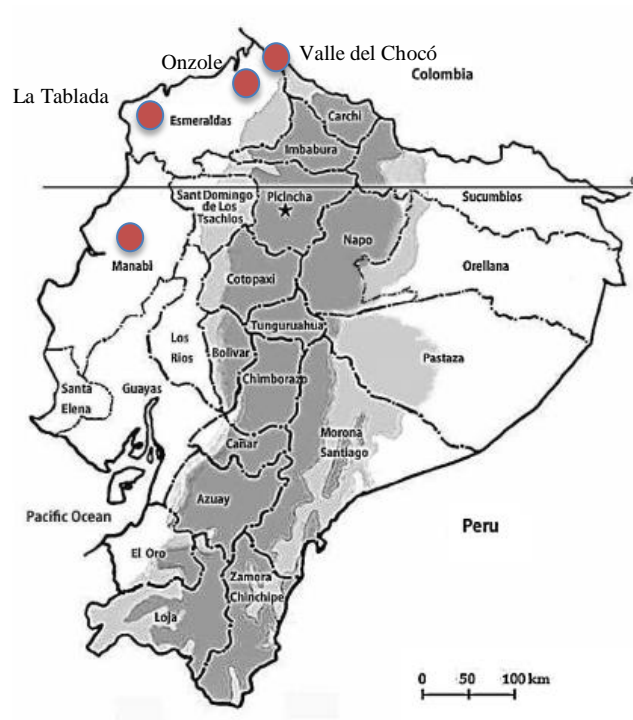


Figura 1. Mapa de las zonas de recolección de Phlebotominae

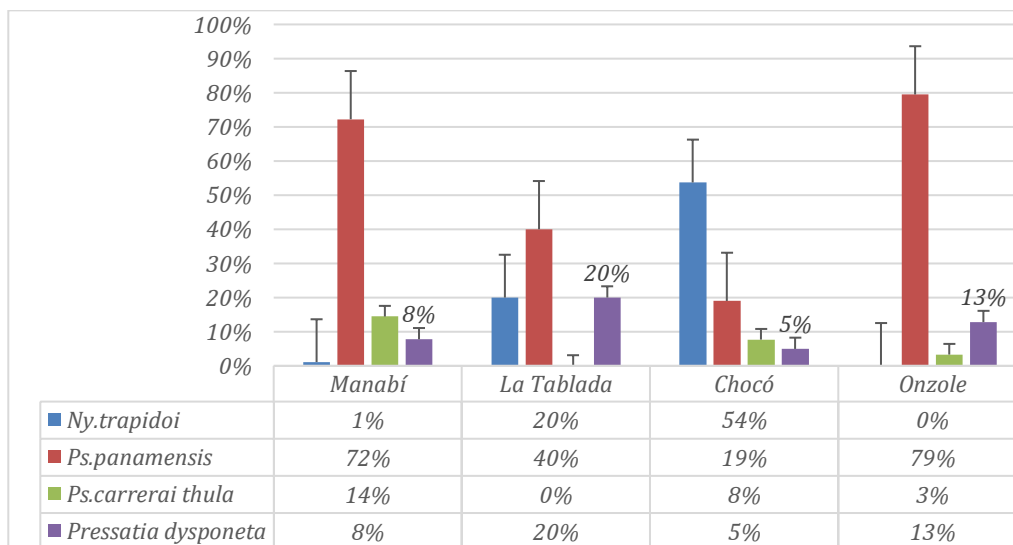


Figura 2. Porcentaje de especies encontradas según la zona de colección

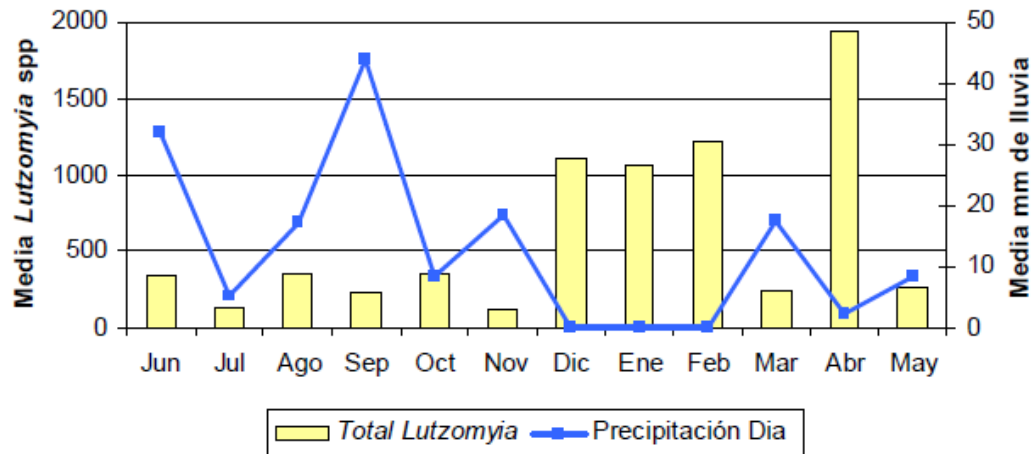


Figura 3. Variación de la abundancia de las especies de *Lutzomyia* según la precipitación en cada mes del año. (Vivero et. Al, 2011)

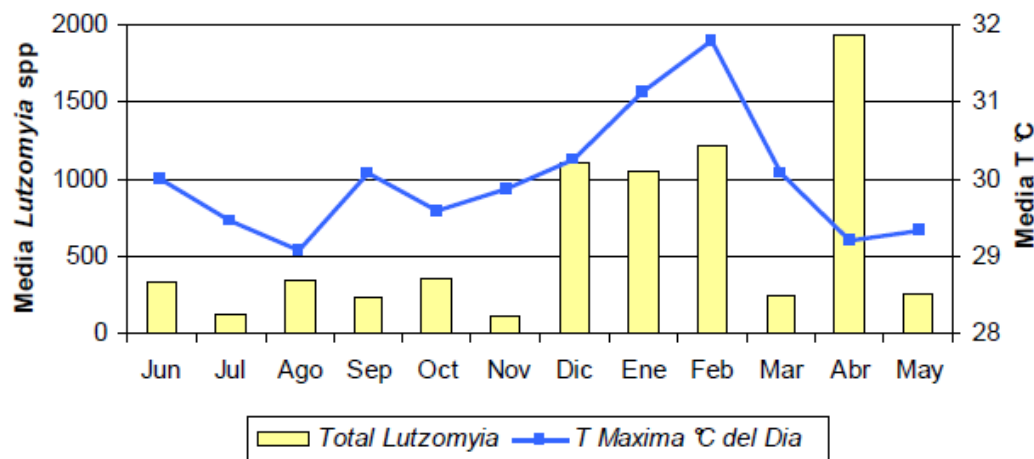


Figura 4. Variación de la abundancia de las especies de *Lutzomyia* según la temperatura en cada mes del año. (Vivero et. Al, 2011)

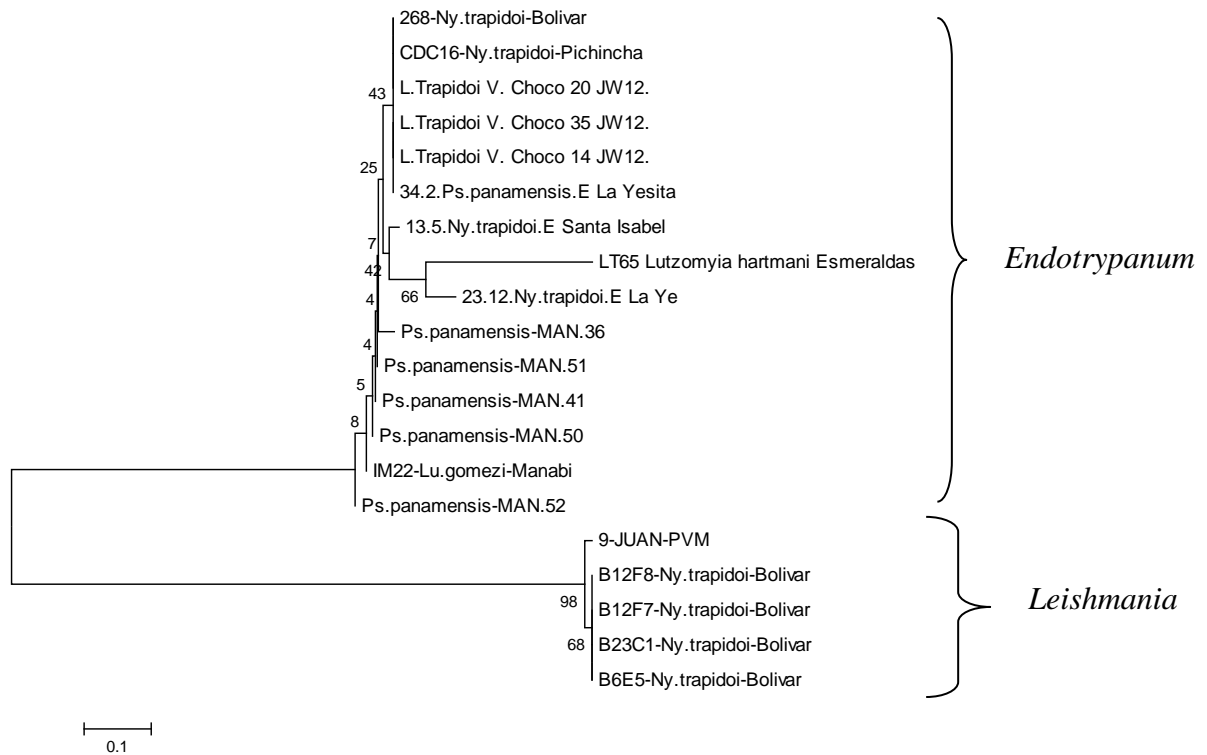


Figura 5. Árbol filogenético de la familia Tripanosomatidae en donde se observa la relación entre *Leishmania* y *Endotrypanum*

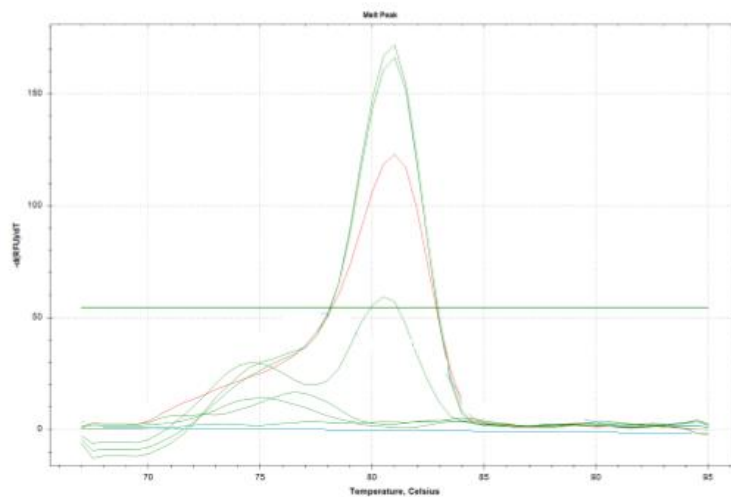
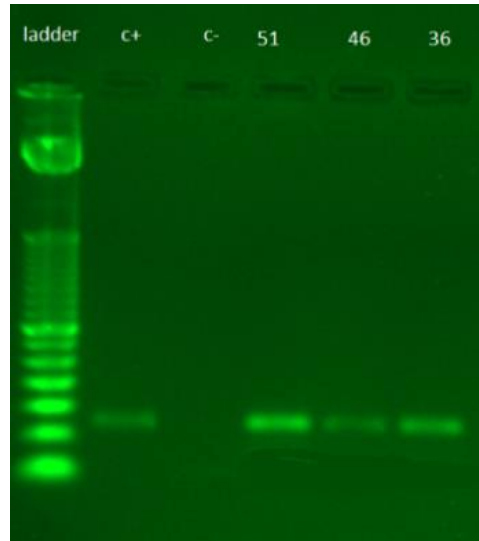
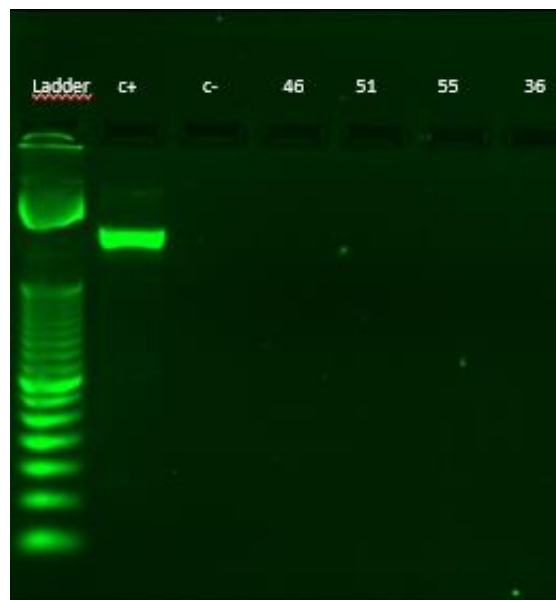


Figura 6. Curva de Melting obtenida a partir del análisis de muestras con primers de ADNk por medio de Real Time PCR para determinar los pools positivos.



C+: ADN de lesiones de Leishmania, C-: ADN de flebótomos machos, 51-46-36: muestras

*Figura 7. Amplificación de ADNk (120 pb) en muestras de ADN de especies de la familia Phlebotominae*



C+: ADN de lesiones de Leishmania , C-: ADN de flebótomos machos, 51-46-36-55:muestras estudiadas

*Figura 8. Amplificación de HSP70 (1422 pb) en muestras de ADN de especies de la familia Phlebotominae*