

ARTÍCULO ORIGINAL

Aspectos ecoepidemiológicos, detección natural e identificación molecular de *Leishmania* spp. en *Lutzomyia reburra*, *Lutzomyia barrettoi majuscula* y *Lutzomyia trapidoi*

Jazzmín Arrivillaga-Henríquez^{1,2,3}, Sandra Enríquez¹, Vanessa Romero^{1,4}, Gustavo Echeverría¹, Jorge Pérez-Barrera¹, Ana Poveda^{1,5}, Juan-Carlos Navarro⁶, Alon Warburg^{2,7}, Washington Benítez^{1,8}

- ¹ Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador
- ² Programa Prometeo, Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), Quito, Ecuador
- ³ Área de Ambiente, Turismo Histórico Cultural, Facultad de Comunicación Social, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador
- ⁴ Facultad de Ciencias Biológicas, Carrera de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador
- ⁵ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador
- ⁶ Laboratorio de Biodiversidad y Salud Ambiental, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Universidad Internacional SEK, Quito, Ecuador
- ⁷ Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Molecular Genetics; Institute of Medical Research Israel-Canada; Kuvim Center for the Study of Infectious and Tropical Diseases, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel
- ⁸ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador

Introducción. La provincia de Pichincha, Ecuador, es un área endémica de leishmaniasis cutánea, en donde se han determinado como vectores los flebotomíneos antropofílicos con infección natural por *Leishmania* spp. Sin embargo, no se ha evaluado el papel en la transmisión de las especies zoofílicas.

Objetivo. Evaluar la infección natural por *Leishmania* en dos especies de flebotomíneos zoofílicos, *Lutzomyia reburra* y *Lu. barrettoi majuscula*, y en una antropofílica, *Lu. trapidoi*, así como la endofagia y la sinantropía de estas especies en el noroccidente de Pichincha.

Materiales y métodos. Los flebotomíneos se recolectaron en trampas de luz CDC colocadas en diferentes hábitats y altitudes en sitios que son focos de leishmaniasis cutánea. La infección con *Leishmania* spp. se detectó en el ADN genómico de hembras de las especies de flebotomíneos de interés. Se amplificó el gen espaciador interno de la transcripción del ARN ribosómico, unidad I (*ITS1*), y los genes de las topoisomerasas mitocondrial II (*mtTOPOII*) y nuclear II (*TopoII*). Se determinaron los porcentajes de positividad para *Leishmania* a escala espaciotemporal, la proporción de endofagia y el índice de sinantropía.

Resultados. Se determinó la presencia de infección natural por *Le. amazonensis* en *Lu. reburra* (9,5 %) y *Lu. b. majuscula* (23,8 %); en *Lu. trapidoi* se detectaron *Le. amazonensis*, *Le. braziliensis* y *Le. naiffi-lainsoni*. Los flebotomíneos eran asinatópicos y con baja endofagia.

Conclusión. Se registró por primera vez la presencia de infección natural en *Lu. reburra* y *Lu. barrettoi majuscula* por *Le. amazonensis*, y se demostró la importancia de los flebotomíneos zoofílicos en el mantenimiento del ciclo de transmisión de *Leishmania* spp. en focos endémicos.

Palabras clave: Psychodidae; *Leishmania*; leishmaniasis cutánea; reacción en cadena de la polimerasa; Ecuador.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3536>

Contribución de los autores:

Jazzmín Arrivillaga-Henríquez: diseño de la investigación, trabajo de campo, identificación de los flebotomíneos, identificación, análisis e interpretación de la secuencias de *Leishmania*, análisis e interpretación de variables ecoepidemiológicas, y escritura del manuscrito
Sandra Enríquez: coordinación logística, análisis de la base de datos ecológicos, trabajo de campo y revisión crítica del documento
Vanessa Romero y Gustavo Echeverría: extracción de ADN, estandarización del protocolo de extracción, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa del gen ITS1 de *Leishmania*

Jorge Pérez-Barrera: amplificación de genes de la topoisomerasa

Ana Poveda: diseños de oligonucleótidos, amplificación, secuenciación y caracterización de las secuencias de las topoisomerasas y escritura del manuscrito

Juan Carlos Navarro: análisis filogenéticos y escritura del manuscrito

Alon Warburg: trabajo de campo y secuenciación de los amplicones de ITS1 de *Leishmania*

Washington Benítez: coordinación del proyecto y escritura del manuscrito

Eco-epidemiological aspects, natural detection and molecular identification of *Leishmania* spp. in *Lutzomyia reburra*, *Lutzomyia barrettoi majuscula* and *Lutzomyia trapidoi*

Introduction: The province of Pichincha in Ecuador is an endemic area of cutaneous leishmaniasis, where anthropophilic sand flies with natural infection by *Leishmania*, have been reported as vectors. However, the role in transmission of zoophilic species has not been evaluated.

Objective: To evaluate natural infection by *Leishmania* in two zoophilic phlebotomine sand fly species, *Lutzomyia reburra* and *Lu. barrettoi majuscula*, and one anthropophilic species, *Lu. trapidoi*, as well as the endophagy and synanthropism of these species in the northwest of Pichincha.

Materials and methods: Phlebotomines were collected using CDC light traps in different habitats and altitudes with presence of cutaneous leishmaniasis. *Leishmania* infection was detected using genomic DNA from females of the collected sand flies. We amplified the internal transcribed spacer gene of ribosomal RNA I (*ITS1*), the mitochondrial topoisomerase II gene (*mtTOPII*), and the nuclear topoisomerase II gene (*TopoII*). Percentages of positivity for *Leishmania*, at spatio-temporal scale, proportion of endophagy and synanthropism index were calculated.

Results: Natural infection was determined for *Le. amazonensis* in *Lu. reburra* (9.5%) and *Lu. b. majuscula* (23.8%), while in *Lu. trapidoi* we detected *Le. amazonensis*, *Le. braziliensis* and *Le. naiffilainsoni*. Phlebotomines were asynanthropic and with low endophagy.

Conclusion: Natural infection with *Le. amazonensis* was recorded for the first time in *Lu. reburra* and *Lu. b. majuscula*, demonstrating the importance of zoophilic phlebotomines in the maintenance of the *Leishmania* transmission cycle in endemic foci.

Key words: Psychodidae; *Leishmania*; leishmaniasis, cutaneous; polymerase chain reaction; Ecuador.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3536>

La diversidad de flebotómicos en Ecuador se ha estudiado en localidades geográficas que son focos activos de transmisión de leishmaniasis cutánea (1-3). La región geográfica de la Sierra, en el noroccidente de la Provincia de Pichincha, es una de las áreas geográficas de mayor riqueza en flora y fauna (4). No obstante, ha sufrido un considerable desarrollo urbanístico en las últimas décadas (5) y muchas de sus zonas se han visto afectadas por el cambio de uso de la tierra, lo cual ha resultado en su caracterización epidemiológica como zonas endémicas de leishmaniasis cutánea (6,7).

Las especies de flebotómicos dominantes en estas zonas, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *trapidoi* (Fairchild y Hertig), *Lu. (Helcocyrtomyia) hartmanni* (Fairchild y Hertig), *Lu. (Lutzomyia) gomezi* (Nitzulescu), *Lu. (Pshychodopygus) panamensis* (Shannon) y *Lu. (Helcocyrtomyia) ayacuchensis* (Cáceres y Galati), presentan una gran actividad antropofílica (8-14). Además, se han recolectado en zonas con alteraciones en la ecología del paisaje por la acción de la deforestación debida a la explotación

maderera y, recientemente, por el desarrollo agropecuario y turístico y la urbanización de zonas rurales (15).

A pesar de que *Lu. trapidoi* y *Lu. hartmanni* son especies antropofílicas (10,14), ocasionalmente se han recolectado en ecosistemas boscosos, cerca de cuevas de armadillos, al igual que *Lu. (Trichophoromyia) reburra* (Fairchild y Hertig), una especie zoofílica asociada a la región andina. En Colombia, *Lu. reburra* está asociada a focos de leishmaniasis cutánea en bosques fragmentados, pero hasta el momento no se ha reportado su infección natural por *Leishmania* (16), lo cual le resta importancia como vector potencial en los estudios ecoepidemiológicos. Otra de las especies recolectadas en cuevas de animales, y asociadas con *Lu. trapidoi* y *Lu. reburra*, es *Lu. (Aragoi) barrettoi majuscula* (Mangabeira), reportada en México como una especie antropofílica (17). Se ha sugerido que en Ecuador esta especie no tiene un comportamiento antropofílico y se asume que es estrictamente zoofílica. La abundancia de estas dos especies zoofílicas de flebotómicos varía, y se ha asociado con focos activos y endémicos de leishmaniasis cutánea (6-14).

Los estudios ecológicos en focos de transmisión activa de leishmaniasis cutánea en el noroccidente de Pichincha, evidencian que varias especies relativamente abundantes y catalogadas como zoofílicas son dominantes pero epidemiológicamente secundarias comparadas con *Lu. trapidoi*, vector

Correspondencia:

Jazmín Arrivillaga-Henríquez, Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis, Unidad de Entomología Aplicada, Universidad Central del Ecuador, Gatto Sobral y Jerónimo Leiton, Edificio Hospital del día, 3er piso, Quito, Ecuador
Teléfono: (593-02) 290 4801
jazzmin.arrivillaga@gmail.com y jcarrivillaga@edu.uce.ec

Recibido: 09/08/16; aceptado: 27/06/17

principal en estos focos (10,13). Sin embargo, no se ha evaluado la presencia de infección natural por *Leishmania* spp. en algunas de estas especies zoonóticas.

Según el contexto ecoepidemiológico, la tasa de infección natural en flebotómicos debe evaluarse en diferentes escalas espaciales, ya que su distribución espacial no es homogénea. Esta aproximación espacio-temporal de la infección natural permite reconocer patrones clave en el riesgo y la vulnerabilidad a la infección por agentes patógenos en una zona geográfica donde el vector incriminado o potencial está presente (18-20), y hacer una valoración rápida de los focos de transmisión y las zonas de riesgo.

En este estudio, la hipótesis que se plantea es que las especies de flebotómicos zoonóticas, principalmente aquellas que están asociadas a cuevas de pequeños mamíferos silvestres incriminados como reservorios potenciales, son sensibles a la infección por *Leishmania* spp. y tienen un papel clave en la circulación de especies de *Leishmania* en focos de gran endemia de leishmaniasis cutánea.

En la detección molecular de *Leishmania* spp. y su tipificación en flebotómicos, se han empleado el gen citocromo b (*Cyt b*) y la subunidad pequeña ribosómica de la región del ARN (SSU-rRNA) (21). En el presente trabajo, se utilizó el gen espaciador interno de la transcripción del ARN ribosómico, unidad I (*ITS1*), propuesto recientemente para una detección más sensible de *Leishmania* spp. que otros marcadores (22), en especial, cuando se debe detectar de forma rápida la leishmaniasis cutánea (23) y genotipificar especies neotropicales del parásito (24).

Por otra parte, aunque las topoisomerasas no se han empleado para la detección de infección natural por *Leishmania* spp. con fines de diagnóstico y diferenciación taxonómica, en una revisión reciente

se analizó su potencial como blanco molecular para el desarrollo de soluciones terapéuticas. Las topoisomerasas tienen un papel esencial como moduladoras de la topología del ADN mediante el control del grado de 'superenrollamiento' del ADN o la eliminación de nudos generados durante procesos celulares como la replicación, la transcripción o la reparación. Se han establecido dos familias de topoisomerasas, las de tipo I y las de tipo II, cuyo mecanismo de acción difiere, lo cual podría tener un valor agregado de diferenciación taxonómica en *Leishmania* spp. dada su variabilidad genética (25,26).

El objetivo general del presente estudio fue evaluar la infección natural por *Leishmania* spp. en dos especies de flebotómicos zoonóticos, *Lu. reburra* y *Lu. barrettoii majuscula*, y en una especie antropofílica, *Lu. trapidoi*, a escala espacio-temporal, así como caracterizar y evaluar la congruencia en la identificación de *Leishmania* spp. en flebotomos mediante el empleo de un fragmento del gen de la topoisomerasa II mitocondrial (*mtTOPOII*) y del gen de la topoisomerasa II nuclear (*TOPOII*) paralelamente con la región ITS-1.

Materiales y métodos

Área de estudio

Los ejemplares se recolectaron en cinco localidades: Milpe (MI), Mashpi (MS), Pedro Vicente Maldonado vía el Progreso (PVM), Puerto Rico-Puerto Quito (PR) y La Isla (I), ubicadas en áreas endémicas de leishmaniasis cutánea en el noroccidente de la provincia de Pichincha (cuadro 1, figura 1). Las localidades se encuentran en dos áreas biogeográficas, el Chocó ecuatoriano y la cordillera Occidental, en donde hay parches de bosque primario húmedo tropical, pero ha habido cambios en el uso de la tierra, principalmente por la actividad agropecuaria y la urbanización de zonas rurales (27).

Cuadro 1. Localidades de estudio en el noroccidente de Pichincha, Ecuador

Localidad/ Cantón	Altitud (msnm)	Coordenadas	Precipitación anual (mm)	Zona de vida con acción sinantrópica
Milpe San Miguel de los Bancos	1.200	00° 02' 19,6" N 78° 52' 37,6" O	1.000 a 2.000	Bosque muy húmedo premontano
Mashpi/Pacto	558	00° 10' 29,4" N 78° 54' 28,5" O	1.800 a 2.000	Bosque siempreverde piemontano
Vía El Progreso/ Pedro Vicente Maldonado	550	00° 04' 26,5" N 79° 02' 57,3" O	1.000 a 2.000	Bosque muy húmedo premontano
Puerto Rico/Puerto Quito	329	00° 05' 33,4" N 79° 14' 33,0" O	2.000 a 4.000	Bosque muy húmedo premontano
Isla/Puerto Quito	122	00° 06' 46,4" N 79° 13' 55,5" O	2.000 a 4.000	Bosque muy húmedo premontano

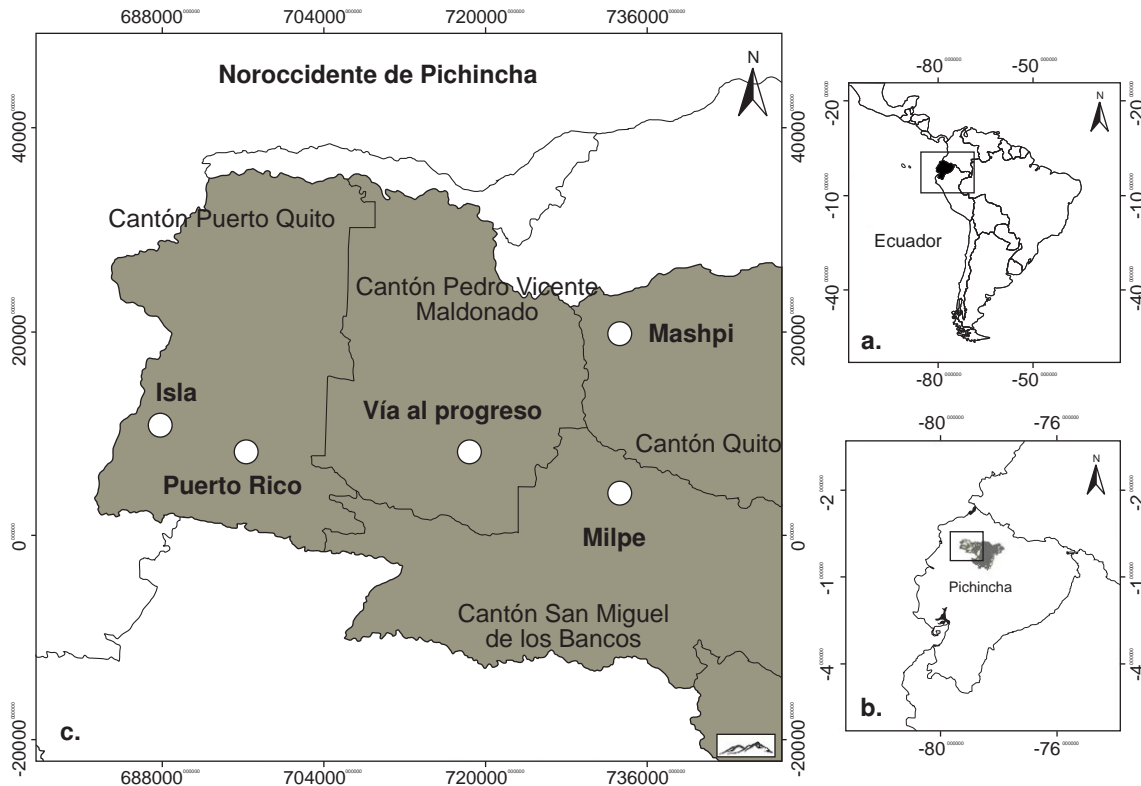


Figura 1. Ubicación geográfica de las cinco localidades de estudio (círculos blancos) en el noroccidente de Pichincha, Ecuador

Las condiciones climáticas de las cinco localidades son similares (28), con variaciones térmicas diarias entre los 17 y los 25 °C, altos niveles de precipitación entre los meses de mayo y julio (260 a 320 mm), y mínimos, entre agosto y marzo (140 a 220 mm); mayo es el mes de mayor precipitación promedio (320 mm), en tanto que en agosto la precipitación es intermedia (220 mm), y en noviembre se registra la menor (190 mm).

Recolección de los flebotomíneos

La recolección se hizo con trampas CDC de luz blanca (27 trampas durante tres noches por localidad y por mes entre las 18:00 y las 06:00 horas), durante los meses de julio y agosto de 2013 y mayo de 2014. Se hicieron tres muestreos: uno para evaluar la infección natural y los otros dos para estudiar los aspectos ecoepidemiológicos de sinantropía y endofagia. Las trampas se ubicaron en cuatro tipos de hábitats: vivienda (intradomicilio), peridomicilio (3 a 60 m de distancia de la vivienda), bosque (el más cercano a la vivienda) y cultivos (papa china, yuca, plátano o cacao), en un gradiente altitudinal de 122 a 1.200 msnm (cuadro 1) dividido en tres categorías: alta (1.200 m), intermedia (500 a 558 m) y baja (122 a 329 m). Las hembras de flebotomíneos

que se posaban sobre los investigadores durante la revisión nocturna de las trampas, se recolectaron con aspiradores manuales.

Identificación de los flebotomíneos

Los ejemplares se separaron individualmente por sexo. Se utilizó la clave taxonómica de Young, *et al.* (14). Las hembras identificadas como *Lu. reburra*, *Lu. trapidoi* y *Lu. barrettoii majuscula* con base en las características del cibario y los genitales, se seleccionaron para la detección molecular de *Leishmania* spp.

Extracción del ADN de los flebotomíneos

Los ejemplares de flebotomíneos almacenados de forma individual en tubos de 1,5 ml a -80 °C, se hidrataron durante 24 horas a temperatura ambiente en 300 µl de solución tampón de hidratación (100 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl, SDS al 0,5 %, 200 mM de sacarosa), según el protocolo de Golczer, *et al.* (29). Para la extracción del ADN se siguió el protocolo de Echeverría, *et al.* (30). Las modificaciones consistieron en agregar 20 µl de proteinasa K en 100 µl de la solución tampón de extracción para incubar cada muestra durante una hora a 60 °C y a 1.300 rpm, y luego a 100 °C

y a 900 rpm durante 10 minutos. Por último, se centrifugó durante cinco minutos a 13.000 rpm, se descartó el *pellet* y el sobrenadante se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior amplificación.

Amplificación y secuenciación del ITS1 de Leishmania

Se amplificó el fragmento ITS-1 de *Leishmania*; se utilizaron los cebadores 100 μM LITSR 5'- CTGG ATCA-TTTTCCGATG - 3' y L5.8S 5' - TGATACCAC TTATCG-CACTT - 3' (22). Como control positivo interno se utilizó ADN de *Lu. trapidoi* previamente amplificado para *Leishmania* y, como control positivo externo, extracto de ADN de la cepa MHOM/BZ/82/BEL21 de *Le. mexicana*. En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplearon: 25 μl por reacción de solución tampón 5X; 2,5 mM de MgCl₂; 100 μM de cada cebador; 10 mM de dNTP; 0,2 μl de Taq ADN polimerasa y 3-4 μl de ADN total extraído de los abdómenes de hembras de las tres especies de flebotómicos con el programa de 40 ciclos de cinco minutos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 segundos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 segundos a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, un minuto a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 10 minutos a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los amplicones de 300 pb se visualizaron en geles de agarosa al 2 % (w/v). Los productos de la PCR se secuenciaron de forma automatizada y directa por Macrogen, utilizando los mismos oligonucleótidos de la PCR.

Identificación de las secuencias del ITS-1 de Leishmania

Las secuencias de ADN se compararon con las del ITS1 del ADN de *Leishmania* disponibles en GenBank por identidad genética mediante búsqueda en la *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

En la segunda fase, las secuencias se alinearon utilizando Clustal W (31) en la aplicación Mac Vector, Inc, ver. 14.5.3 (#9000566 a SCW y JCN) y ajustes manuales. Para el alineamiento basado en homologías, se consideraron valores altos de penalización (15 para la creación y la extensión de las *gap*). Se utilizaron las siguientes secuencias del ITS1 de *Leishmania* reportadas en GenBank como referencias de *Leishmania* neotropicales: *Le. amazonensis* (gi806777491, kp274862), *Le. mexicana* (gi577861716), *Le. braziliensis-Lbrasil-104* (gi806777492), *Le. guyanensis* (gi685205147), *Le. lainsoni* (gi577861646), *Le. naiffi-lainsoni42* (gi76577722), *Le. panamensis* (gi227976411), *Le. peruviansis* (gi577861653), *Le. naiffi*, *Le. sp* (gi262652965) y *Le. siamensis* (367461079).

Además, se incluyeron las siguientes secuencias de *Leishmania* del Viejo Mundo pertenecientes al subgénero *Leishmania* como grupo externo: *Le. tropica* (gi577861678), *Le. major* (gi687045625), *Le. donovani* (gi577861702) y *Le. infantum* (gi10303005103).

Como criterio preliminar de diferenciación entre las secuencias de *Leishmania* spp., se recurrió a un análisis de similitud global mediante el método de unión de vecinos (*Neighbor Joining*, NJ) (32) y bajo los supuestos del modelo Kimura2P para los cálculos de distancia genética (K2P) mediante el programa PAUP 4.0a149, 2016 (33).

Por último, las secuencias se analizaron con un criterio filogenético, utilizando el análisis de máxima parsimonia derivado de la presencia de datos informativos o sinapomorfias. Los caracteres se trataron con igual ponderación y, posteriormente, se pesaron de nuevo con base en el índice de consistencia recalculada (RCI) mediante una búsqueda heurística de 1.000 réplicas iniciales con barrido de ramas, utilizando la bisección y la reconexión de árboles (*Tree Bisection-Reconnection*, TBR). Como soporte de los grupos o clados, se utilizó el método de *bootstrap* con 10 réplicas de adición al azar por 500 'pseudoréplicas de remuestreo', eliminando los caracteres no informativos (34,35).

Amplificación, secuenciación e identificación de las topoisomerasas II mitocondrial y nuclear de Leishmania spp.

El fragmento caracterizado de la topoisomerasa II mitocondrial (mtTOPO II) se amplificó usando los oligonucleótidos LmxM15.1290 - F1 (AAGGA GATGG TGCCTTC; posición a 2.011 pb desde el inicio del gen) y LmxM15.1290-R1 (TCCATGTAG TCCAGGAGT; posición a 2.399 pb desde el inicio del gen). El fragmento mtTOPOII comprende los nucleótidos del 2.097 al 2.389. Con el gen *mtTOPOII* se evaluaron 26 muestras de ADN extraído de flebotómicos positivos para *Leishmania* mediante amplificación previa del ITS1.

Para la amplificación del gen *TOPOII* se utilizaron los oligonucleótidos LmxM.28.2280 - F1 (AAGC GCAACTTGGTGAAGTCTC), ubicados a 2.101 pb desde el inicio del gen, y LmxM.28.2280 - R1 (ATGAGCCGGGTGAAGATGTA), ubicados a 2.330 pb desde el inicio del gen. Ambos pares de oligonucleótidos se diseñaron en el presente estudio. Para la amplificación se siguieron las instrucciones del fabricante (Invitrogen Taq DNA polymerase), con 25 μl por reacción: solución tampón 1X; 5 mM de

MgSO₄; 0,2 mM de cada cebador; 0,2 mM de dNTP; 0,2 µl de Taq ADN polimerasa, y 3 µl de ADN total extraído de flebotomos positivos para *Leishmania* spp., según lo determinado en la amplificación de la región ITS-1 con el programa de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C, y un minuto a 72 °C. Los amplicones se enviaron a MacroGen y se secuenciaron de forma directa con los mismos cebadores de la amplificación.

Las secuencias alineadas y los análisis de similitud global se hicieron bajo los mismos criterios del análisis de la región ITS-1. Sin embargo, las secuencias de mtTOPOII y de TOPOII de las siguientes especies de *Leishmania*, empleadas como referencia para el análisis, se obtuvieron de la base de datos pública GeneDB (36): *Le. infantum* (LinJ.15.1310), *Le. major* (LmjF.15.1290), *Le. donovani* (LdBPK_151310.1), *Le. braziliensis* (LbrM.15.1230), *Le. mexicana* (LmxM.15.1290) y *Le. amazonensis* (>A20130 |DNA_1 220..3930|.|-|.Scaffold871); la secuencia de *Leishmania amazonensis* se obtuvo de GeneLGE. Sin embargo, no se hicieron análisis de parsimonia debido a la ausencia de sinapomorfias en las secuencias de ADN obtenidas para los dos tipos de topoisomerasas.

Cálculo de porcentaje de positividad para *Leishmania*

Se calculó el porcentaje de positividad para *Leishmania* del número total de especies de flebotomíneos y de cada una de ellas en particular por localidad, intervalo de altitud, hábitat y precipitación en el mes de recolección. El porcentaje se calculó estableciendo la proporción del número de hembras positivas con relación al número de hembras procesadas mediante PCR, de manera que si todas las hembras recolectadas se procesaran, el porcentaje de positivas equivaldría a la tasa máxima de infección. Para las muestras en las que no se procesaron todas las hembras recolectadas, este cálculo correspondió a la tasa de infección mínima (37).

Cálculo de la endofagia

El valor de la endofagia para las tres especies de flebotomíneos se calculó, según Santamaria, et al. (9), en función del número de ejemplares capturados en el intradomicilio dividido por el número de ejemplares capturados en el peridomicilio, lo cual indica la proporción de ejemplares del peridomicilio que podrían entrar a la vivienda.

Cálculo de la sinantropía

Se calculó el valor de la sinantropía para las tres especies de flebotomíneos según el método de

Figueroa-Roa, et al. (38), modificado para la escala de distribución microespacial del presente trabajo, así: 2 x el porcentaje de ejemplares recolectados en la vivienda + porcentaje de ejemplares recolectados en el peridomicilio – 2 x el porcentaje de ejemplares recolectados en el bosque/2. El índice de sinantropía varía de +100 a -100. Los valores positivos indican que una especie está asociada al ambiente humano, específicamente a las viviendas (intradomicilio), en tanto que los valores negativos indican que las especies evitan este ambiente. Los valores numéricos mínimos son el cero, el valor intermedio es 50 y un valor de 100 representa el máximo valor numérico para este índice, independientemente de su signo.

Análisis estadístico

La asociación entre la variable del porcentaje de positividad para *Leishmania* en flebotomíneos (total y para cada una de las tres especies estudiadas), y las variables de localidad, hábitat, intervalo de altitud y precipitación por mes de muestreo, se evaluaron mediante la prueba estadística de ji al cuadrado (χ^2), usando el programa estadístico SPSS®, versión 15.0 (39).

Resultados

Diagnóstico molecular de *Leishmania*

Se recolectaron 26 especies pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae en el gradiente altitudinal estudiado (no se presentan los datos). Solo tres especies, *Lu. trapidoi*, *Lu. reburra* y *Lu. b. majuscula*, se seleccionaron para el diagnóstico molecular de la infección natural por *Leishmania* spp. en hembras procesadas de forma individual que no habían ingerido sangre ni portaban huevos. *Lutzomyia trapidoi* se seleccionó por ser la especie más abundante durante el muestreo y vector comprobado en el noroccidente de Pichincha. Se procesó el 4 % (124 hembras) de los ejemplares recolectados de esta especie. *Lutzomyia reburra* se seleccionó por ser una especie dominante y la segunda en abundancia después de *Lu. trapidoi* en varias de las localidades; se procesaron todos los individuos (50 hembras). *Lutzomyia b. majuscula* se seleccionó porque ha sido asociada a las cuevas de armadillos y en este estudio fue la especie de mayor abundancia espacial entre aquellas de menor abundancia (1 %); se procesaron todos los individuos (47 hembras).

Se detectó infección por *Leishmania* en las tres especies de flebotomíneos en función del gen *ITS1*, evidenciándose la presencia de una banda

de 300 pb en la muestra de control (cultivo de *Leishmania*), similar a la banda amplificada a partir de las muestras del abdomen de las hembras (figura 2).

Porcentaje de positividad para *Leishmania* a escala espacio-temporal con base en el ITS1

Localidad. Los porcentajes de positividad fueron mayores para el total de flebotomíneos en la localidad de La Isla, y solo las hembras de dos especies estaban infectadas, con un porcentaje de positividad en *Lu. reburra* mayor que el de *Lu. b. majuscula*. La siguiente localidad con mayor porcentaje de positividad total fue Milpe, km 91, donde se encontraron tres especies con infección natural; dicho porcentaje fue mayor en *Lu. trapidoi*, seguido de *Lu. reburra* y de *Lu. b. majuscula*. En las localidades de Mashpi, Puerto Rico y Pedro Vicente Maldonado, se obtuvieron porcentajes de positividad asociados a la presencia de una sola especie de flebotomíneo. En Mashpi se encontró *Lu.*

b. majuscula, en tanto que *Lu. trapidoi* se encontró en las dos últimas localidades mencionadas (figura 3a). Las diferencias en el porcentaje de positividad total por localidad se confirmaron estadísticamente ($\chi^2=15,01$; $gl=4$; $p=0,005$). Sin embargo, la diferencia en dicho porcentaje por especie en las localidades no fue estadísticamente significativa para ninguna de las especies estudiadas: *Lu. trapidoi*, *Lu. b. majuscula* y *Lu. reburra* ($\chi^2=2,63$, $gl=4$, $p=0,652$; $\chi^2=5,76$, $gl=4$, $p=0,214$; y $\chi^2=7,82$, $gl=4$, $p=0,154$, respectivamente).

Hábitat. El mayor porcentaje de positividad total para *Leishmania* se encontró en el peridomicilio, seguido del intradomicilio, el bosque y los cultivos. En las viviendas se encontraron dos especies positivas para *Leishmania*: *Lu. trapidoi* y *Lu. reburra*. En el peridomicilio y en el bosque, se encontraron las tres especies con infección natural, pero con diferentes porcentajes de positividad. La mayor positividad en el peridomicilio la presentó *Lu. b. majuscula* y, en el bosque, *Lu. trapidoi*. En los cultivos, principalmente los de cacao, solo *Lu. trapidoi* resultó con infección, con un porcentaje de positividad comparativamente bajo (10 % aproximadamente, figura 3b). En general, se observó una tendencia a registrar mayores porcentajes de positividad para *Leishmania* en los ambientes transformados por el hombre (vivienda y peridomicilio) (figura 3b). Sin embargo, las diferencias en el porcentaje de positividad total por hábitat no fueron confirmadas estadísticamente ($\chi^2=1,6$; $gl=3$; $p=0,67$). Asimismo, no se confirmaron estadísticamente las diferencias aparentes entre el porcentaje de positividad por especie de flebotomíneo según el hábitat (*Lu. trapidoi*: $\chi^2=4,47$, $gl=3$, $p=0,21$; *Lu. reburra*: $\chi^2=2,99$, $gl=2$, $p=0,25$, y *Lu. b. majuscula*: $\chi^2=3,03$, $gl=2$, $p=0,27$).

Altitud. En la altitud intermedia (500 a 550 msnm), el porcentaje de positividad para *Leishmania* se debió a la presencia de dos especies de flebotomíneos con infección natural, *Lu. trapidoi* y *Lu. b. majuscula*. En la altitud extrema (1.200 msnm) o en la más baja (122 a 329 msnm), las tres especies se encontraron infectadas con porcentajes de positividad diferentes. En la altitud máxima, la especie con mayor positividad fue *L. trapidoi*, seguida de *Lu. b. majuscula* y de *Lu. reburra*. Por el contrario, en la menor altitud, la especie con mayor positividad fue *Lu. b. majuscula* seguida de *Lu. reburra* y de *Lu. trapidoi* (figura 3c). Las diferencias mencionadas en el porcentaje de positividad total por altitud se confirmaron estadísticamente ($\chi^2=8,7$; $gl=2$; $p=0,01$). Sin embargo, por especie de flebotomíneo solo se

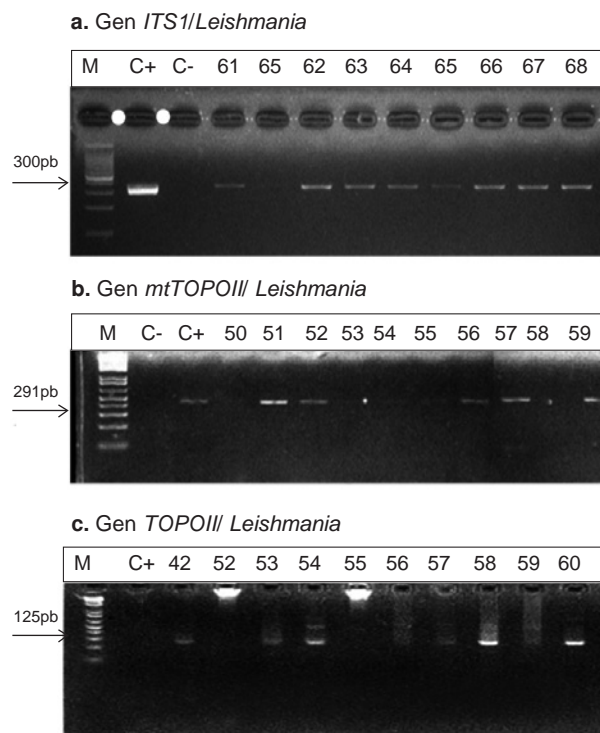


Figura 2. Geles de agarosa al 2 %. **a)** ITS1; **b)** mtTOPOII, y **c)** TOPOII de *Leishmania* spp., amplificadas a partir de ADN de flebotomíneos. Los números sobre cada carril corresponden al número de cada muestra de ADN evaluada. ITS1: gen espaciador interno de la transcripción del ARN ribosómico, unidad 1; mtTOPOII: gen de la topoisomerasa I mitocondrial; TOPOII: gen de la topoisomerasa II nuclear; M: marcador molecular de 100 pb; C +: control positivo de ADN de *Leishmania*; C -: control negativo

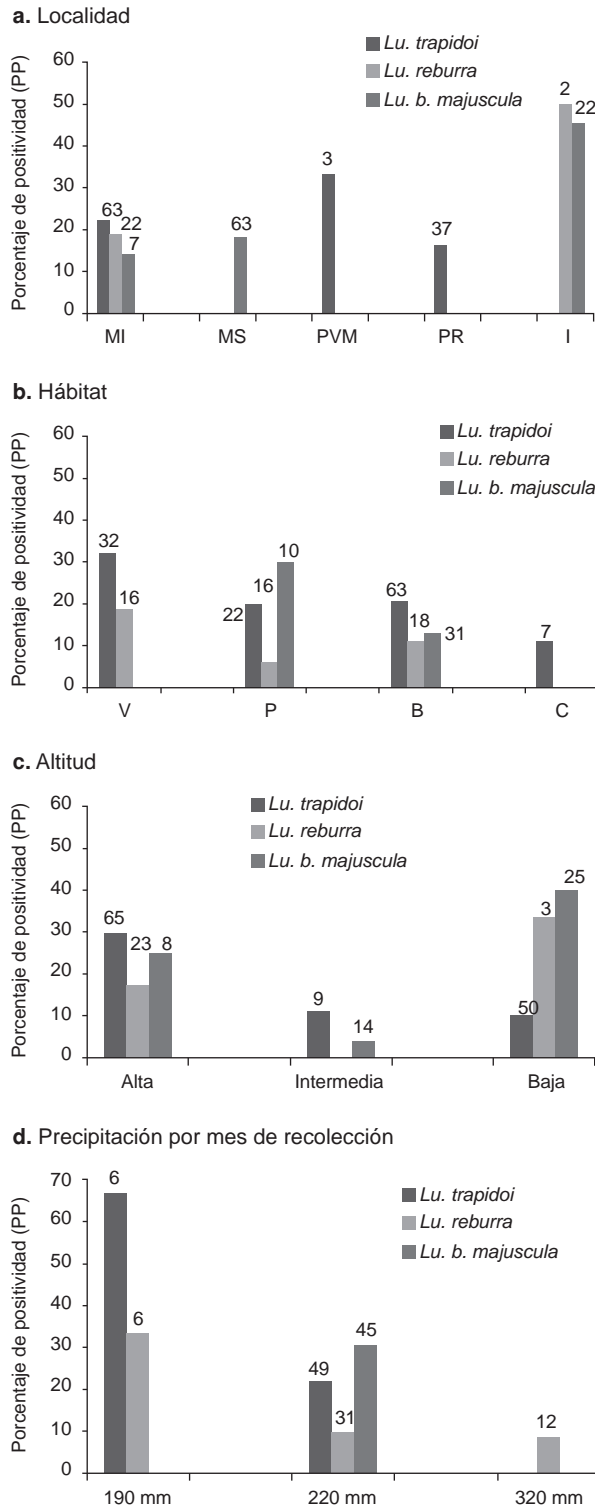


Figura 3. Distribución del porcentaje de positividad para *Leishmania* en tres especies de *Lutzomyia* según: **a)** localidad, **b)** hábitat, **c)** altitud y **d)** precipitación por mes de recolección. MI: Milpe; MS: Mashpi; PVM: Pedro Vicente Maldonado; PR: Puerto Rico; I: Isla; V: vivienda-intradomicilio; P: peridomicilio; B: bosque; C: cultivos. El número sobre cada barra representa el número de hembras analizadas con base en el *ITS1*.

confirmaron estadísticamente las diferencias en los porcentajes de positividad según la altitud para *Lu. reburra* ($\chi^2=6,0$; $gl=2$; $p=0,05$).

Precipitación. En noviembre, el mes de menor precipitación, se registró el mayor porcentaje de positividad total de hembras de dos de las especies: *Lu. trapidoi* y *Lu. reburra*. En agosto, mes con niveles intermedios (220 mm) de precipitación, se registró el segundo mayor porcentaje de positividad total para *Leishmania* en las tres especies, siendo el porcentaje de positividad de *Lu. b. majuscula* mayor que el de *Lu. trapidoi* y *Lu. reburra*. Por el contrario, en mayo, el mes de mayor precipitación, con 320 mm, la única especie recolectada en la que se encontró infección por *Leishmania* fue *Lu. reburra* (figura 3d). Las diferencias mencionadas entre las variables del porcentaje de positividad total y la precipitación, se confirmaron estadísticamente ($\chi^2=11,5$; $gl=2$; $p<0,001$). Sin embargo, las diferencias en el porcentaje de positividad por especie de flebotomíneo en relación con la precipitación no fueron estadísticamente significativas (*Lu. trapidoi*: $\chi^2=2,37$, $gl=2$, $p=0,41$; *Lu. reburra*: $\chi^2=0,59$, $gl=2$, $p=1,0$; *Lu. b. majuscula*: $\chi^2=0,91$, $gl=2$, $p=1,0$).

Identificación molecular de *Leishmania* con base en el fragmento *ITS-1*

Los análisis de las secuencias del *ITS1* permitieron tipificar bajo un criterio filogenético la determinación taxonómica de tres especies de *Leishmania*. La primera correspondió a *Le. amazonensis*, la especie de parásito más abundante (83 %), presente en *Lu. reburra*, *Lu. barrettoi majuscula* y *Lu. trapidoi*. El árbol filogenético evidenció la existencia de una politomía en el nodo D, y no se encontraron linajes en la especie *Le. amazonensis*, independientemente de la localidad muestreada y de la especie de flebotomíneo (figura 4).

Leishmania braziliensis (4,7 %) se detectó en la localidad de Puerto Rico, y se determinaron filogenéticamente dos secuencias diferentes sin divergencia nucleotídica, lo cual indica que pertenecen a un mismo grupo monofilético, representado por el nodo B21. Una tercera especie de *Leishmania* se detectó en la localidad de Milpe con base en una sola secuencia amplificada, y se identificó como *Le. naiffi-Le. lainsoni* (2,3 %) por su identidad con la secuencia de referencia del Genbank agrupada en el nodo B22. Las dos especies de *Leishmania* detectadas solo se encontraron en *Lu. trapidoi* (figuras 4 y 5).

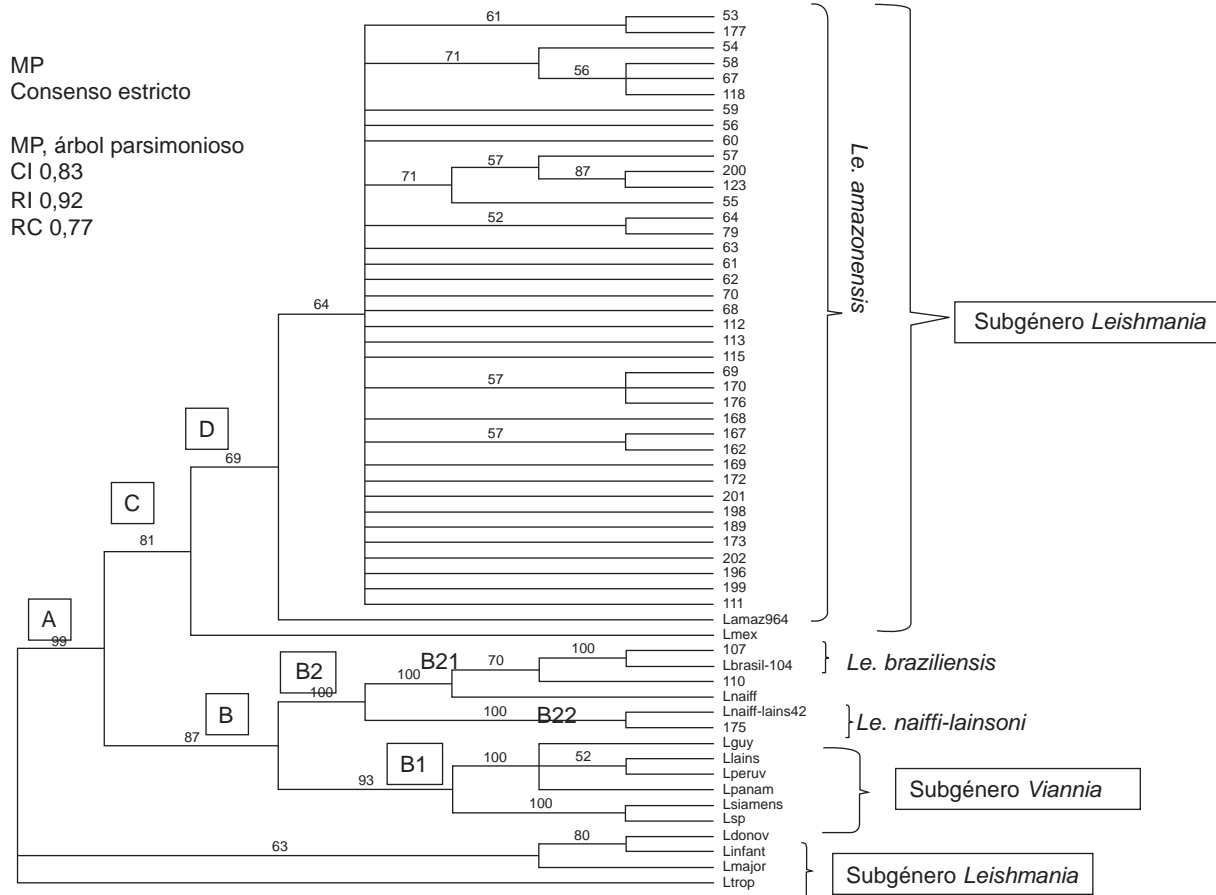


Figura 4. Análisis filogenético de máxima parsimonia (MP), consenso estricto. Secuencias del *ITS1* de *Leishmania* obtenidas de amplificaciones a partir de *Lu. trapidoi*, *Lu. reburra* y *Lu. b. majuscula*. A, B, C, D, B1, B2, B21 B22 son nodos del árbol.

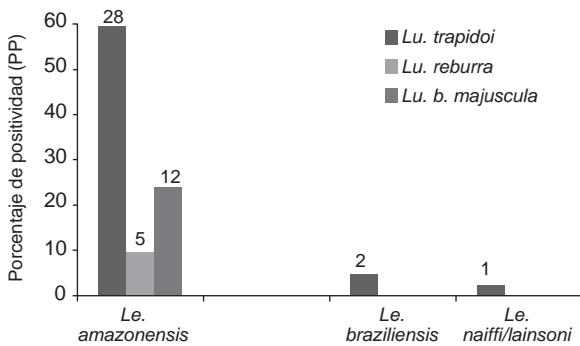


Figura 5. Porcentaje de positividad según la especie de *Leishmania* tipificada con base en el *ITS1* en tres especies de *Lutzomyia*. El número sobre cada barra representa el número de hembras de *Lutzomyia* analizadas.

Identificación de *Leishmania* con base en el fragmento de *mtTOPOII*

El 61,5 % de las muestras seleccionadas a partir de aquellas positivas con base en el *ITS1*, y amplificadas con base en el *mtTOPOII*, correspondieron a

16 secuencias de 292 pb pertenecientes a las tres especies de flebotomíneos (figura 6a). El análisis de similitud global (NJ) evidenció que 15 de las 16 secuencias obtenidas eran idénticas y pertenecían a un mismo haplogrupo del subgénero *Leishmania*, y se asociaban específicamente por similitud global con secuencias de *Le. amazonensis* (figura 6a). Una secuencia del *mtTOPOII*, amplificada a partir de una muestra de *Lu. trapidoi* y denominada como secuencia MT107, se asoció al grupo del subgénero *Viannia* y se identificó como *Le. braziliensis* (figura 6a).

Identificación de *Leishmania* con base en el fragmento *TOPOII*

En el análisis de similitud global se evidenció que todas las 13 secuencias analizadas de este gen fueron idénticas y pertenecían a un genotipo distinto del de las secuencias de *Le. mexicana* presentes en el grupo del subgénero *Leishmania*. Las secuencias se tipificaron como *Le. amazonensis* con base en el *ITS1* y la topoisomerasa *mtTOPOII*. Sin embargo,

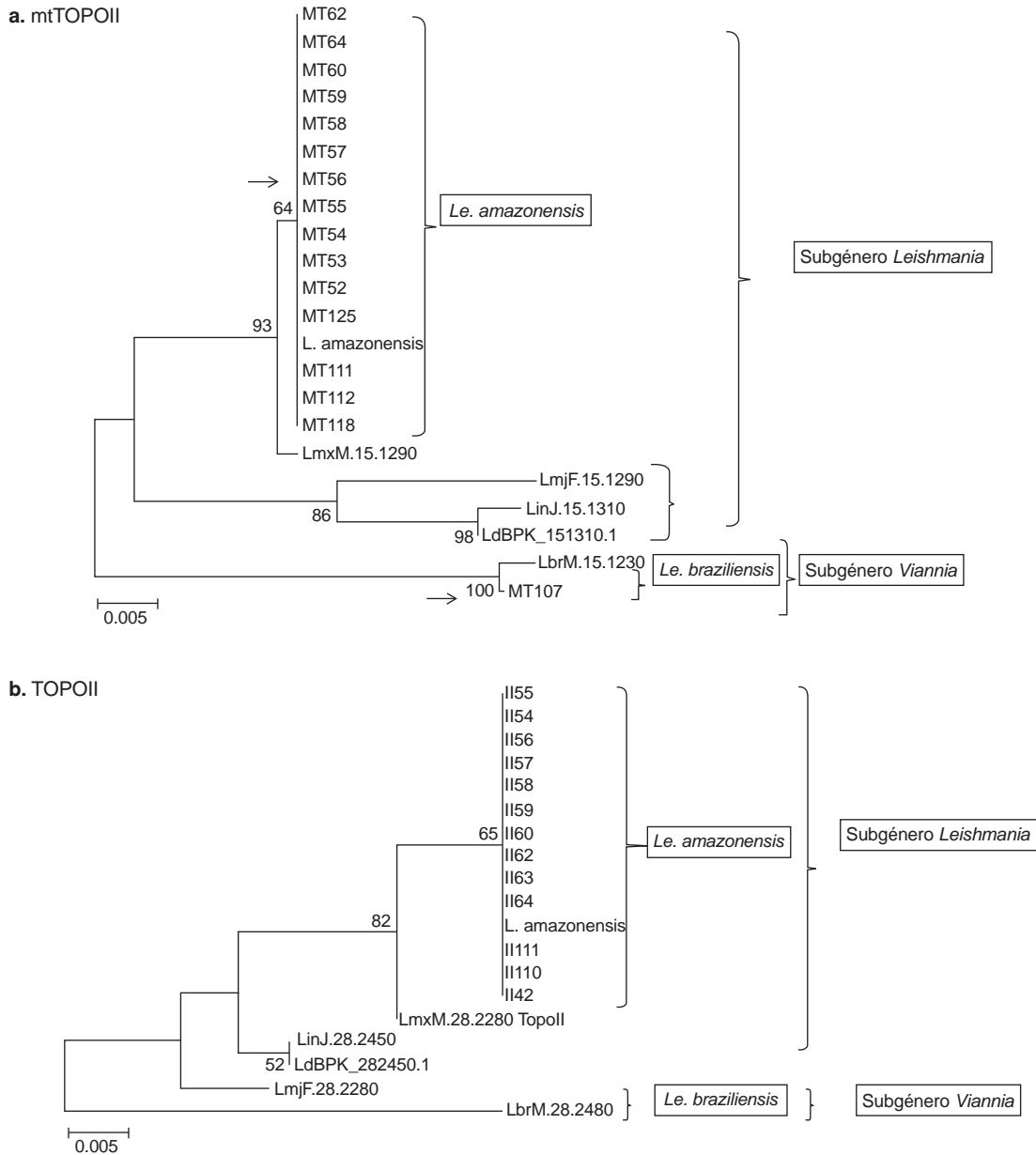


Figura 6. Análisis de similitud global (NJ) de las secuencias de dos topoisomerasas de *Leishmania*: **a)** topoisomerasa I mitocondrial (mtTOPOII), y **b)** topoisomerasa II nuclear (TOPOII). Las flechas indican las dos secuencias-linajes para mtTOPOII.

no se observaron cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína, en contraste con las secuencias obtenidas para mtTOPOII, en las cuales la variación nucleotídica del gen se tradujo en cambios en las secuencias de aminoácidos de la topoisomerasa mitocondrial (no se muestran los datos) (figura 6b).

Los resultados de la identificación por similitud global de una secuencia de *Leishmania* denominada como MT110 y detectada en un ejemplar de *Lu. trapidoi* recolectado en Puerto Rico, no fueron congruentes.

Los análisis con el *ITS1* mostraron que esta secuencia es cercana filogenéticamente a *Le. naiffi* y *Le. braziliensis*, en tanto que, con base en la mtTOPOII, se agrupó con *Le. amazonensis* (figura 5b). Por esta razón, no se la incluyó en los análisis de tipificación de *Leishmania* a la espera de otros análisis.

Endofagia. El valor más alto de endofagia (0,38) se obtuvo para *Lu. reburra* (24/62 individuos, intradomicilio/peridomicilio), seguido por *Lu. trapidoi* (0,15) (57/370), en tanto que para *Lu. b. majuscula*, dicho valor fue de cero (0/10).

Sinantropía. Todas las especies resultaron ser asinatóricas con respecto al área de la vivienda, pues los valores fueron negativos. Sin embargo, *Lu. reburra* presentó el valor menos negativo (-10,1) comparado con los de *Lu. b. majuscula* (-72,7) y *Lu. trapidoi* (-69,3).

Discusión

Se detectó *Leishmania* en *Lu. reburra*, *Lu. barrettoii majuscula* y *Lu. trapidoi* mediante el análisis concordante de *ITS1*, *mtTOPOII* y *TOPOII*, lo cual evidencia el potencial de las topoisomerasas para la tipificación de la infección natural por *Leishmania* en flebotomíneos.

Los porcentajes de positividad para *Leishmania* fueron significativamente altos en cada especie, siendo comparables con los de *Leishmania* en flebotomíneos neotropicales, los cuales oscilan entre 6,9 y 92,8 %. En el caso de *Lu. reburra* y *Lu. barrettoii majuscula*, los valores del porcentaje de positividad correspondieron a la tasa de infección máxima, es decir, 12 y 31,1 %, respectivamente, ya que se procesaron todas las hembras recolectadas de forma individual. Por el contrario, los porcentajes de positividad de *Lu. trapidoi* correspondieron a la tasa mínima de infección natural debido a que solo se procesó el 4 % de las hembras; los valores de infección natural encontrados estuvieron dentro del intervalo de tasa mínima de infección para el diagnóstico molecular en flebotomíneos neotropicales, principalmente los antropofílicos, la cual oscila entre 0,06 y 3,9 % (8-13,37,40-45).

Los altos valores de positividad registrados en el presente estudio podrían explicarse por la gran diversidad de la fauna silvestre que puede servir de reservorio en el Chocó ecuatoriano, al cual pertenece biogeográficamente la región del noroccidente de Pichincha, donde, a pesar del grado de intervención de los bosques, hay una diversidad comparativamente mayor a la de otros focos de las zonas andinas (15), lo que favorece el solapamiento del nicho ecológico espacio-temporal de los flebotomíneos y los huéspedes potenciales de *Leishmania*. La ausencia de una estacionalidad acentuada de las variables de precipitación y temperatura, con la presencia de periodos largos (ocho meses) de poca precipitación mensual (149 a 220 mm) y periodos cortos (cuatro meses) de alta precipitación mensual (240 a 320 mm), favorece la persistencia de las poblaciones de estos tres flebotomíneos en la zona de muestreo, siendo la precipitación una variable macroclimática aparentemente importante para la dinámica de transmisión de la leishmaniasis (20).

En el noroccidente de Pichincha, la circulación de las especies detectadas de *Leishmania* se da entre los meses de agosto y mayo, lo que equivale, por lo menos, a una presencia de *Leishmania* durante 83,3 % del año. Desde el punto de vista ecoepidemiológico, noviembre es el mes de máxima positividad para *Leishmania* y, en consecuencia, la máxima transmisión debería registrarse antes del inicio del periodo de mayor precipitación, cuando la abundancia de hembras infectadas baja significativamente.

La mayor abundancia de hembras positivas se asoció, aparentemente, a los ambientes con actividad de construcción de vivienda, lo que sugiere un ciclo doméstico de transmisión asociado a la vivienda rural, principalmente en el peridomicilio. De ahí la necesidad de adoptar medidas de prevención y control de vectores en este hábitat. Sin embargo, este mayor riesgo de picaduras infectivas en el intradomicilio debe confirmarse, pues no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de positividad para *Leishmania* y la variable de hábitat.

La detección molecular de la infección natural en *Lu. trapidoi*, con una positividad para *Leishmania* de 23,3 %, evidenció el papel de esta especie como vector en la región de la sierra ecuatoriana (2,7,13) donde *Lu. trapidoi* se ha encontrado con infección natural por *Le. panamensis*, *Le. naiffi*, *Le. guyanensis* y *Le. panamensis/guyanensis* (6-7,13).

En el presente trabajo se encontró infección natural con tres especies de *Leishmania* pertenecientes a dos subgéneros: *Leishmania* (*Le. amazonensis*) y *Viannia* (*Le. braziliensis* y *Le. naiffi-lainsoni*), especies detectadas por primera vez en *Lu. trapidoi*, lo cual es indicativo de su papel como vector potencial. Además, este resultado representa el primer registro de *Le. amazonensis* en la sierra ecuatoriana, pues antes solo se había registrado en la región de la costa ecuatoriana (7,13).

Asimismo, se registra por primera vez en Ecuador la presencia del híbrido de *Leishmania* *Le. naiffi-lainsoni*, lo cual sugiere la circulación de *Le. naiffi* y *Le. lainsoni* en el noroccidente de Pichincha (21), especies estas registradas previamente solo en la Amazonia ecuatoriana, y explicaría por qué la región de la sierra es una zona ecológica para el intercambio genético entre estas especies de *Leishmania* (43).

Leishmania braziliensis se ha encontrado en la provincia de Pichincha en pacientes con leishmaniasis cutánea en las localidades de San Miguel

de Los Bancos, Puerto Quito y Pedro Vicente Maldonado; esta especie se había registrado ya en la Amazonia y en la costa ecuatoriana (21). En el presente estudio, se detectó en ejemplares de *Lu. trapidoi* recolectados en la localidad de Puerto Rico. Así, se propone a *Lu. trapidoi* como el vector primario de *Le. braziliensis* en la provincia de Pichincha, región de la sierra, dada la presencia, en esta misma zona, de casos clínicos de leishmaniasis en humanos causados por la misma especie de *Leishmania*.

Además, se detectó por primera vez la infección natural por *Le. amazonensis* en *Lu. reburra* y *Lu. b. majuscula*, siendo la especie de mayor abundancia en la zona de muestreo; se detectó, asimismo, en *Lu. trapidoi* con un alto porcentaje de infección (59,5 %), lo cual evidencia la importancia de este flebotomíneo como vector primario debido a su dominancia, antropofilia y amplia distribución espacial en el gradiente altitudinal en aquellos focos más activos y de mayor incidencia de leishmaniasis cutánea, como Pedro Vicente Maldonado (PVM-vía El Progreso) y Puerto Quito (Puerto Rico).

En cuanto a los valores de endofagia y sinantropía, y a la amplia presencia de los flebotomíneos con infección por *Le. amazonensis*, *Lu. trapidoi* presentó valores significativamente menores en comparación con *Lu. reburra*, lo cual sugiere que constituye un vector potencial secundario de *Le. amazonensis* dado su porcentaje de positividad (9,5 %), una presencia más prolongada de hembras infectadas (40 %) en las localidades, y su comportamiento zoofílico y antropofílico (se recolectaron hembras de forma incidental durante los muestreos de *Lu. trapidoi*).

Lutzomyia reburra se encontró en gran abundancia en las localidades de Milpe y La Isla. En Milpe, la incidencia de leishmaniasis cutánea en humanos ha sido menor que en Pedro Vicente Maldonado y Puerto Quito (7). Por el contrario, en la localidad de La Isla no se han registrado casos de leishmaniasis cutánea según los informes de la propia comunidad en las encuestas sobre conocimientos, aptitudes y prácticas en torno a la leishmaniasis. Así, se registró circulación de *Le. amazonensis* sin que, aparentemente, se hayan dado casos clínicos en humanos asociados a esta especie en el noroccidente de Pichincha (21).

Por otro lado, a pesar de que las hembras infectadas de *Lu. b. majuscula* presentaron un mayor porcentaje de positividad para *Le. amazonensis* (23,8 %) que *Lu. reburra* (9,5 %), su importancia

vectorial posiblemente se restringe a un periodo específico, ya que solo se recolectaron adultos en agosto, durante el periodo de menor precipitación.

Desde el punto de vista espacial, las hembras infectadas de *Lu. b. majuscula* se encontraron en 60 % de las localidades muestreadas, principalmente en el peridomicilio y en el bosque, y con un comportamiento de picadura exofílico y exofágico, derivado de su preferencia por alimentarse con sangre de animales silvestres, lo cual la cataloga como zoofílica, al menos en las localidades estudiadas.

Los resultados de este estudio sugieren la existencia de dos ciclos de transmisión de *Le. amazonensis* en la sierra ecuatoriana. El primero es un ciclo enzoótico, mantenido potencialmente por, al menos, tres especies de flebotomíneos: 1) *Lu. trapidoi*, vector primario si se atiende a su abundancia relativamente alta, a la elevada tasa de infección natural, a su dominancia y a la amplia distribución espaciotemporal en el noroccidente de Pichincha; 2) *Lu. reburra*, vector secundario debido a su menor dominancia, la amplitud intermedia de su distribución espacial, y a la mayor presencia espacial de hembras infectadas comparada con *Lu. Trapidoi*, y 3) *Lu. b. majuscula*, vector terciario según su tasa de infección natural, menor distribución espaciotemporal y solapamiento con *Lu. trapidoi* y *Lu. reburra* en el mes de mayor porcentaje de positividad para *Leishmania*. El segundo ciclo es doméstico, y en su transcurso *Lu. trapidoi* y *Lu. reburra* serían los vectores responsables de la translocación de *Le. amazonensis* del ciclo de transmisión silvestre al ciclo de transmisión doméstico, dado el mayor riesgo de endofagia en el peridomicilio.

Se ha señalado que el ciclo de *Le. amazonensis* en focos endémicos depende de las especies dominantes primarias o secundarias (21), pero para confirmar esta hipótesis es necesario evaluar en campo, entre otras variables ecológicas, la preferencia alimentaria, la tasa de picadura y la actividad nocturna. La presencia de ADN de *Leishmania* en el abdomen de una hembra evidenció que hubo multiplicación del parásito en el mesenterón, lo que desde el punto de vista biológico es clave cuando se evalúa el papel de una especie de flebotomíneos como vector local.

Por último, será necesario hacer seguimiento activo de los pacientes para la detección y la tipificación de *Le. amazonensis*, ya que no solo está implicada en los casos humanos de leishmaniasis cutánea en el Neotrópico, sino que se ha señalada como agente etiológico en algunos casos de leishmaniasis muco-

cutánea y, en especial, de leishmaniasis visceral atípica en humanos y caninos (45-49). En cuanto a los casos clínicos potencialmente asociados con *Le. amazonensis*, se esperaría una mayor incidencia en altitudes extremadamente altas o bajas, dado el alto porcentaje de positividad para *Lu. trapidoi* como vector primario.

Agradecimientos

A Orlando Chiluisa, Ernesto Villacrés y Katherine Pozo, estudiantes de Ciencias Biológicas y Ambiente de la UCE, por su colaboración en el trabajo de campo. A Franklin Vaca, por su apoyo técnico en campo. A Paúl Duque, por el diseño del mapa. A Gustavo Benaim y Graciela Uzcanga, del Instituto IDEA de Venezuela y la Universidad Internacional SEK de Ecuador, por facilitar la cepa de referencia MHOM/BZ/82/BEL21 de *Leishmania mexicana*.

Conflicto de intereses

No se declara ningún conflicto de intereses.

Financiación

El Centro de Investigación en Salud Pública y Zoonosis y el Instituto de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, recibieron financiación de la Fundación para la Asistencia Médica Internacional de Portugal. El Programa Prometeo-Senescyt de Ecuador otorgó apoyo a Jazmín Arrivillaga Henríquez y a Alon Warburg. Ana Poveda recibió financiación para el proyecto #21 de la Dirección General de Investigación y Posgrado, Universidad Central del Ecuador y de la *Academie de Recherche et d'Enseignement Supérieur* (ARES) de Bélgica.

Referencias

- Alexander JB, Takaoka H, Eshita Y, Gómez EA, Hashiguchi Y.** New records of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Ecuador. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992;87:123-30. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000100019>
- LePont F, León R, Guerrini F, Gantier JC, Mouchet J, Echeverría R, et al.** Leishmaniasis in Ecuador. 3. *Lutzomyia trapidoi*, vector of *Leishmania panamensis*. *Ann Soc Belg Med Trop.* 1994;74:23-8.
- Jones LA, Cohnstaedt LW, Beati L, Terán R, León R, Munstermann LE.** New records of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Ecuador. *Proc Entomol Soc Wash.* 2010;112:47-53. <https://doi.org/10.4289/0013-8797-112.1.47>
- Araújo P, Bersosa F, Carranco R, Granda V, Guerra P, Miranda N, et al.** Evaluación preliminar de la diversidad de escarabajos (Insecta: Coleoptera) del Chocó ecuatoriano. *Revista Politécnica, Biología.* 2005;26:120-40.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos.** Estadística demográfica en el Ecuador. Quito: INEC; 2010. p. 300.
- Calvopina M, Armijos RX, Hashiguchi Y.** Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: Current status of knowledge -- a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:663-72. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000700001>
- Calvopiña M, Loor R, Lara F, Zambrano P, Hashiguchi Y.** Prevalencia y formas clínicas de las leishmaniasis en el noroccidente de la provincia de Pichincha, Ecuador. *Rev Fac Cien Med Quito.* 2012;37:31-8.
- Kato H, Uezato H, Gómez EA, Terayama Y, Calvopina M, Iwata H, et al.** Establishment of a mass screening method of sand fly vectors for *Leishmania* infection by molecular biological methods. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:324-9.
- Santamaría E, Ponce N, Zipa Y, Ferro C.** Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania (Viannia) panamensis* en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia. *Biomédica.* 2006;26:82-94. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1503>
- Gómez EA, Kato H, Mimori T, Hashiguchi Y.** Distribution of *Lutzomyia ayacuchensis*, the vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis, at different altitudes on the Andean slope of Ecuador. *Acta Trop.* 2014;137:118-22. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.05.006>
- Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, Barroso PA, et al.** Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:87-93.
- Duque P, Vélez I, Morales M, Sierra D.** Sand flies fauna involved in the transmission of cutaneous leishmaniasis in afro-Colombian and Amerindian communities of Chocó Pacific Coast of Colombia. *Neotrop Entomol.* 2004;33:255-64. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2004000200018>
- Gómez EA, Kato H, Hashiguchi Y.** Man-biting sand fly species and natural infection with the *Leishmania* promastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. *Acta Trop.* 2014;140:41-9. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.003>
- Young DG, Duncan M.** Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Gainesville, Florida: Associated Publishers; 1994.
- Ministerio del Ambiente de Ecuador.** Línea base de deforestación del Ecuador Continental. Quito: Ministerio del Ambiente del Ecuador; 2012. p. 1-32.
- Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez ID.** Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:645-7. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000500010>
- Rebollar-Téllez E, Ramírez-Fraire A, Andrade-Narváez FJ.** A two years study on vectors of cutaneous leishmaniasis. Evidence for sylvatic transmission cycle in the state of Campeche, México. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996;91:555-60. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761996000500004>

18. **Rodrigues W, Medeiros J, Julião GR, Ríos-Velásquez CM, Marialvac EF, Desmouliérec S, et al.** Anthropogenic effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in an Amazonian rural settlement, Brazil. *Acta Trop.* 2014;139:44-52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.017>
19. **Plisco P, Fuentes-Castillo T.** Modelación de la distribución de especies y ecosistemas en el tiempo y en el espacio: una revisión de las nuevas herramientas y enfoques disponibles. *Rev Geogr Norte Gd.* 2011;48:61-79. <https://doi.org/10.4067/S0718-34022011000100005>
20. **Quintana MG, Salomón OD, De Grosso MS.** Distribution of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a primary forest-crop interface, Salta, Argentina. *J Med Entomol.* 2010;47:1003-10.
21. **Kato H, Gómez EA, Martini-Robles L, Muzzio J, Vélez L, Calvopiña M, et al.** Geographic distribution of *Leishmania* species in Ecuador based on the cytochrome B gene sequence analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10:e0004844. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004844>
22. **El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, El Safi SH, et al.** *Leishmania donovani*: Intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp Parasitol.* 2001;97:35-44. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4592>
23. **Hijawi N, Kanani KA, Rasheed M, Atoum M, Abdel-Dayem M, Irhimeh MR.** Molecular diagnosis and identification of *Leishmania* species in Jordan from saved dry samples. *Biomed Res Int.* 2016;2016:6871739. <https://doi.org/10.1155/2016/6871739>
24. **Freitas-Lidani KC, Messias-Reason IJ, Ishikawa EA.** A comparison of molecular markers to detect *Lutzomyia longipalpis* naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109:442-7. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130285>
25. **Uzcanga G, Lara E, Gutiérrez, Beaty D, Beske T, Teran R, et al.** Nuclear DNA replication and repair in parasites of the genus *Leishmania* exploiting differences to develop innovative therapeutic approaches. *Crit Rev Microbiol.* 2017; 43:156-77. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1188758>
26. **Pommier Y.** Drugging topoisomerases: Lessons and challenges. *ACS Chem Biol.* 2013;8:82-95. <https://doi.org/10.1021/cb300648v>
27. **Villacis B, Carrillo D.** Estadística demográfica en el Ecuador: diagnóstico y propuesta. Quito: Instituto Nacional de Estadística y Censos; 2011. p. 1-74.
28. **Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología.** Anuario Meteorológico N° 52-2012. Quito: INMH; 2012. p. 132.
29. **Golczer G, Arrivillaga J.** Modificación de un protocolo estándar de extracción de ADN para flebotominos pequeños (Phlebotominae: *Lutzomyia*). *Rev Col Entomol.* 2008;34: 199-202.
30. **Echeverría-Fonseca G, Mera-Ruiz PA, Carrillo-Toro J, Rodríguez-Hidalgo R.** A new DNA extraction protocol for screwworm fly *Cochliomyia* species (Diptera: Calliphoridae). *Front Environ Sci.* 2015;2:68. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00068>
31. **Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R.** Clustal V improved software for multiple sequence alignment. *Comp Appl Biosci.* 1992;8:189-191.
32. **Saito N, Nei M.** The neighbor-joining method a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4:406-25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
33. **Swofford DL.** PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sunderland, MA: Sinauer association Inc; 2001. <http://benedick.rutgers.edu/software-manuals/PAUP4-manual.pdf>
34. **Arrivillaga JC, Norris D, Feliciangeli MD, Lanzaro G.** Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infect Genet Evol.* 2002;2:83-95. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(02\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(02)00087-4)
35. **Arrivillaga J, Mutebi JP, Piñango H, Norris D, Alexander B, Feliciangeli MD, et al.** The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. *J Med Entomol.* 2003;40:615-27.
36. **Logan-Klumpler FJ, De Silva N, Boehme U, Rogers MB, Velarde G, McQuillan J, et al.** GeneDB-an annotation database for pathogens. *Nucl Acids Res.* 2012;40:98-108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1032>
37. **Paiva BR, Oliveira AG, Dorval MEMC, Galati EAB, Malafronte RS.** Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Acta Trop.* 2010;115:126-30. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.02.013>
38. **Figueroa-Roa L, Linhares A.** Synanthropy of Muscidae (Diptera) in the city of Valdivia, Chile. *Neotrop Entomol.* 2004;33:647-51. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X200400500016>
39. **SPSS, INC.** Statistical Package for the Social Sciences. Version 15.0. Chicago, IL: SPSS; 2006.
40. **Grimaldi G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barret TV.** Characterization and classification of leishmanial parasite from humans, wild mammals, and sandflies in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1981;44:645-61. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.645>
41. **Ferreira AL, Sessa PA, Malta-Varejao JP, Falqueto A.** Distribution of sand flies (Diptera: Psychodidae) at different altitudes in a endemic region of American cutaneous leishmaniasis in the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:1061-7. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000800006>
42. **Armijos RX, Chico M, Cruz M, Guderian R, Kreutzer R, Berman J, et al.** Human cutaneous leishmaniasis in Ecuador: Identification of parasites by enzyme electrophoresis. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;42:424-8. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.424>
43. **Bañuls AL, Guerrini F, Le Pont F, Barrera C, Espinel I, Guderian R, et al.** Evidence for hybridization by multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA between *Leishmania brasiliensis* and *L. panamensis/guyanensis* in Ecuador. *J Eukaryot Microbiol.* 1997;44:408-11. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1997.tb05716.x>
44. **Hashiguchi Y, Gómez E, de Coronel VV, Mimori T, Kawabata M, Furuya M, et al.** Andean leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania mexicana* and *L. major-like* parasites. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44:205-17. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.205>

45. **Da Silva ACT, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GA.** Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, State of Acre, Brazil. *Trop Med Inter Health*. 2006;11:1388-98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01695.x>
46. **Jennings Y, Almeida A.** Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania*. *Parasite*. 2014;21:1-11. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014039>
47. **Aleixo JA, Nascimento ET, Monteiro GR, Fernandes MZ, Ramos AM, Wilson ME, et al.** Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100:79-82. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.06.025>
48. **Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JA, Barbosa JE, et al.** The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba county, São Paulo state, Brazil. *Vet Parasitol*. 2007;149:280-4. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.008>
49. **Hoffmann AR, Navarro IT, Camargo VE Jr, Caldart ET, Breganó RM, Pereira PM.** *Leishmania amazonensis* in dog with clinical diagnosis of visceral leishmaniasis in Paraná state, Brazil - a case report. *Semina: Ciências Agrárias*. 2012;33:3265-70.