FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

¨ Diversidad de la microbiota de flebótomos obtenidos en San Miguel de los Bancos, Pedro Vicente Maldonado, Mashpi y Puerto Quito, Pichincha – Ecuador, mediante secuenciación de 3era generación ¨

Realizado por:

Daniela Alejandra Velasco Uquillas

Director del proyecto:

José Rubén Ramírez Iglesias

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

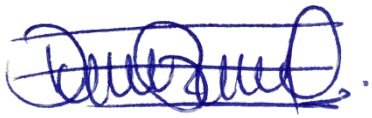
Quito, 2 de Octubre de 2023

¨Diversidad de la microbiota de flebótomos obtenidos en San Miguel de los Bancos, Pedro Vicente Maldonado, Mashpi y Puerto Quito, Pichincha – Ecuador, mediante secuenciación de 3era generación¨

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, **DANIELA ALEJANDRA VELASCO UQUILLAS**, ecuatoriana, con cédula de ciudadanía N° 1719639518, declaro bajo juramento que el Proyecto de Investigación titulado: **Diversidad de la microbiota de flebótomos obtenidos en San Miguel de los Bancos, Pedro Vicente Maldonado, Mashpi y Puerto Quito, Pichincha – Ecuador, mediante secuenciación de 3era generación** es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento.

A través de esta declaración, cedo los derechos de propiedad intelectual a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido en la Ley de Propiedad Intelectual, reglamento y normativa institucional vigente.



Daniela Alejandra Velasco Uquillas

C.C.: 1719639518

¨Diversidad de la microbiota de flebótomos obtenidos en San Miguel de los Bancos, Pedro Vicente Maldonado, Mashpi y Puerto Quito, Pichincha – Ecuador, mediante secuenciación de 3era generación¨

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

José Rubén Ramírez Iglesias

C.C.: 3050666993

¨Diversidad de la microbiota de flebótomos obtenidos en San Miguel de los Bancos, Pedro Vicente Maldonado, Mashpi y Puerto Quito, Pichincha – Ecuador, mediante secuenciación de 3era generación¨

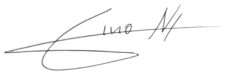
LOS PROFESORES INFORMANTES

Juan Carlos Navarro

Lino Arisqueta

Después de revisar el Proyecto de Investigación, lo han calificado como apto para su defensa oral ante el tribunal examinador.

Juan Carlos Navarro
CC: 1757166614



Lino Arisqueta
CC: 1756916456

Quito, 2 de Octubre de 2023

¨Diversidad de la microbiota de flebótomos obtenidos en San Miguel de los Bancos, Pedro Vicente Maldonado, Mashpi y Puerto Quito, Pichincha – Ecuador, mediante secuenciación de 3era generación¨

DEDICATORIA

A mi madre y a mi hermano por el inmenso apoyo y la constante motivación que me brindaron a lo largo de mi arduo viaje para completar este reto personal. Desde el inicio de este desafío académico hasta su culminación, su respaldo inquebrantable fue un faro de inspiración que iluminó mi camino. A mis amigos Soledad, Fernanda, Mishell, Juan y Santiago, quienes me recordaron mis habilidades, me inspiraron a perseverar y estuvieron a mi lado para encontrar soluciones ante cada incertidumbre. A mis docentes de la UISEK y doctores de la UCE por fortalecer mi amor la ciencia, la investigación y sobre todo la confianza en mí.

¨Diversidad de la microbiota de flebótomos obtenidos en San Miguel de los Bancos, Pedro Vicente Maldonado, Mashpi y Puerto Quito, Pichincha – Ecuador, mediante secuenciación de 3era generación¨

AGRADECIMIENTOS

Centro de Investigación en Zoonosis (CIZ) perteneciente a la Universidad Central del Ecuador (UCE) por proveer las muestras para este estudio; Soledad Cisneros por los conocimientos impartidos y apoyo brindado; Dr. Juan Carlos Cazar, Universidad Central del Ecuador (UCE) por otorgar la respectiva autorización para destinar parte de mi tiempo a este estudio.

Artículo de tesis

Diversidad de la microbiota de flebótomos obtenidos en San Miguel de los Bancos, Pedro Vicente Maldonado, Mashpi y Puerto Quito, Pichincha – Ecuador, mediante secuenciación de 3era generación.

Daniela Velasco[1], José Rubén Ramírez[2] and Juan Carlos Navarro[3]*

[1] Maestría en Biomedicina, Fac Cs Salud, UISEK; daniela.velasco@uisek.edu.ec
[2] Facultad de Ciencias de la Salud, UISEK; jose.ramirez@uisek.edu.ec
[3] Facultad de Ciencias de la Salud, UISEK; juancarlos.navarro@uisek.edu.ec
* Autor de correspondencia: juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

Resumen: El flebótomo, es conocido como vector de enfermedades como Leishmaniasis y Bartonelosis. En el 2019, a nivel global se registraron más de 800 000 casos de enfermedades transmitidas por este insecto. Estudios indican que la composición bacteriana de la microbiota de vectores puede potenciar su capacidad vectorial. Sin embargo, no existe evidencia de estudios en la microbiota de flebótomos en la región de Pichincha, Ecuador. El objetivo del presente estudio fue determinar el perfil metagenómico basado en 16S bacteriano de los flebótomos *Lutzomyia trapidoi* y *L. hartmanni* obtenidos en el bosque andino del noroccidente de Pichincha – Ecuador, mediante secuenciación masiva de tercera generación con la finalidad de identificar el perfil bacteriano de estos vectores de acuerdo con el sitio al que pertenecen y analizar si representan un riesgo para la salud de las comunidades humanas que habitan en estas zonas. Se realizó la extracción de ADN de 150 flebótomos previamente recolectados en San Miguel de los Bancos, Pedro Vicente Maldonado, Mashpi y Puerto Quito, por el CIZ. Se procedió a la amplificación de 16S con adaptadores OXO y posteriormente se realizó la agrupación de acuerdo con las variables de especie, sexo y sitio de recolección. Se procedió a secuenciar utilizando el MinION y el análisis de datos se realizó mediante la plataforma EPI2ME. Se encontraron bacterias pertenecientes al filo Bacillota y cercanas al género *Bacillus*, así como, bacterias pertenecientes a los géneros *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*. Las bacterias gram negativas predominan en la microbiota del flebótomo por lo que se puede deducir que estas desempeñan roles fundamentales en el metabolismo y desarrollo del sistema inmune de este insecto. Es posible que variables como la temperatura y altura influyan en la variabilidad de bacterias ambientales en las distintas localidades de estudio. Hay evidencia de bacterias patógenas para el ser humano que podrían estar ligadas al potencial vectorial del flebótomo.

***Palabras clave*:** Neotrópico; Metagenómica bacteriana; *Lutzomyia*; 16S; MinION; Secuenciación por nanoporos

Abstract: The sandfly, known as a vector for diseases such as Leishmaniasis and Bartonellosis. In 2019, more than 800,000 cases of diseases transmitted by this insect were reported globally. Studies indicate that the bacterial composition of vector microbiota may enhance their vectorial capacity. However, there is no evidence from studies on sandfly microbiota in the Pichincha region, Ecuador. The aim of this study was to determine the metagenomic profile based on bacterial 16S of *Lutzomyia trapidoi* and *L. hartmanni* sandflies collected in the Andean forest in northwestern Pichincha, Ecuador, using third-generation massive sequencing to identify the bacterial profile of these vectors according to their collection site and to analyze if they represent a health risk to the human communities living in these areas. DNA was extracted from 150 sandflies previously collected in San Miguel de los Bancos, Pedro Vicente Maldonado, Mashpi, and Puerto Quito by CIZ. The 16S amplification with OXO adapters was performed, followed by clustering based on species, sex, and collection site variables. Sequencing was carried out using the MinION, and data analysis was conducted through the EPI2ME platform. Bacteria belonging to the Bacillota phylum and closely related to the *Bacillus* genus were found, as well as bacteria from the *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* genera. Gram-negative bacteria predominated in the sandfly microbiota, suggesting that they play fundamental roles in the insect's metabolism and immune system development. It is possible that variables such as temperature and altitude influence the variability of environmental bacteria in different study locations. There is evidence of human pathogenic bacteria that may be associated with the sandfly's vector potential.

***Keywords*:** Neotropic; Bacterial metagenomics; *Lutzomyia*; 16S; MinION; Nanopore sequencing

1. Introducción

Los artrópodos son considerados como vectores por su capacidad de transmitir enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias o protozoarios (Wilson et al., 2020). La propagación de estos patógenos puede ocurrir cuando el vector se alimenta de la sangre infectada de un hospedador y luego transmite la infección a uno nuevo, durante su siguiente alimentación. Las enfermedades de transmisión vectorial son variadas y pueden darse entre personas o incluso de animal a persona (World Health Organization, 2022b). Según Wilson et al. (2020), estas

enfermedades amenazan a más del 80% de la población mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, 2022b) indica que a nivel mundial ocurren más de 700.000 muertes anuales causadas por una enfermedad de transmisión vectorial.

De acuerdo con Wu-Chuang et al. (2021), entre los diversos tipos de artrópodos que actúan como portadores de enfermedades infecciosas, el mosquito es destacado como el principal transmisor. Un pariente cercano de los mosquitos que también juega un papel significativo en la transmisión de patógenos a los humanos son los flebótomos (Lantova & Volf, 2014).

El flebótomo pertenece al filo Arthropoda, clase Insecta, orden Diptera, familia Psychodidae, subfamilia *Phlebotominae* y género *Lutzomyia*. Este último incluye cerca de 82 especies de flebótomos que se distribuyen en todo el mundo, principalmente en regiones con clima cálido y húmedo (Rodrigues & Galati, 2023; Schoch et al., 2020). En contraste, Kamhawi (2006) afirma que se conocen alrededor de 400 especies de flebótomos, pero sólo 50 de estas especies son responsables por la transmisión de parásitos como *Leishmania*, mientras que Benallal et al. (2022) afirman que son 950 las especies de flebótomos que han sido clasificadas, de las cuales a 100 se les atribuye la transmisión de patógenos. En el Ecuador, Jones et al., (2010) identificaron 25 especies de flebótomos del área de Tiputini, Puerto Quito y otras áreas, predominando la presencia del género *Lutzomyia*.

Los flebótomos del género *Lutzomyia* pueden alcanzar un tamaño de 2,5 a 4 milímetros de longitud. Poseen un cuerpo alargado, delgado, peludo, flexible con una pequeña cabeza. El color de estos insectos es variable, pero suele abarcar tonos amarillentos-grisáceos, marrones y presentan manchas o bandas claras (Leonel et al., 2020; Rodrigues & Galati, 2023). Los flebótomos presentan 2 pares de alas membranosas que les permiten desplazarse en el vuelo de manera ágil y precisa (Gálvez et al., 2018), así como patas largas y delgadas para sujetarse a superficies irregulares. Los machos difieren morfológicamente de las hembras por sus genitales y las particulares formas de sus cuerpos. Mientras los machos presentan espinas bien definidas, las hembras tienen formas más redondas y no tienen espinas (El Sawaf et al., 2022). La fuente de alimentación de ambos sexos proviene de sustancias de origen vegetal, sin embargo, las hembras durante su etapa reproductiva se alimentan de sangre (Rodrigues & Galati, 2023).

Su ciclo de vida incluye cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto, por lo que se considera que realizan una metamorfosis completa (Kamhawi, 2006). Los huevos son puestos en suelos cálidos, húmedos, arenosos y oscuros con altas cantidades de materia orgánica, la cual es necesaria para que la larva se alimente (Gálvez et al., 2018), de ahí que se conozca a estos insectos como “sand fly” o mosca de arena. Las larvas emergen y se alimentan de la materia orgánica y microorganismos presentes en el suelo donde fueron depositados previamente los huevos (Sierra A. et al., 2000). En estos suelos es donde la etapa de pupa se llevará a cabo y donde el cuerpo del insecto se reorganizará y se formarán las estructuras adultas (Benallal et al., 2022). Los flebótomos adultos hembras se alimentan mediante la succión de sangre por medio de picadura (Jones et al., 2010).

La OMS (World Health Organization, 2022a) indica que su comportamiento de alimentación y descanso depende de la especie y región que habitan, así como de la especie del flebótomo. Se encuentran en zonas tropicales, húmedas y cálidas como selvas, bosques y zonas rurales de América del Sur y Central. Maroli & Khoury (2004) mencionan que la dispersión de estos artrópodos toma lugar en áreas donde el viento es moderado y hay escasez de precipitaciones. Según estudios previos se ha determinado que la temperatura mínima en la que el flebótomo se mantiene activo es de 17ºC (Cetin & Ozbel, 2017). Sin embargo, varios aspectos de su biología, como la maduración y eclosión de los huevos, así como la duración de las etapas de su ciclo de vida, depende mucho de las variaciones climáticas (Narasimhan & Fikrig, 2015; Rodrigues & Galati, 2023).

Al flebótomo se lo conoce principalmente por ser transmisor del protozoario *Leishmania* y del microorganismo *Bartonella* (Lantova & Volf, 2014). Según la OMS (World Health Organization, 2022a), anualmente se notifican entre 498.000 a 862.000 casos de enfermedades transmitidas por flebótomos a nivel mundial, de las cuales el promedio anual de casos sólo en América es mayor a 53 000; siendo Brasil, Colombia y Perú los países más afectados en el 2020 (Organización Panamericana de la Salud, 2021). El Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades de Perú (CDC Perú) (Centro Nacional de Epidemiología, 2023), hasta la tercera semana del presente año 2023 se reportaron 93 casos de enfermedades transmitidas por flebótomos ampliamente distribuidas en este país.

En cuanto a enfermedades como la leishmaniasis y bartonelosis, en el Ecuador se ha informado una disminución de 1106 casos, en el año 2019, a 982 casos en el 2020. Sin embargo, de acuerdo con la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2023) (DNVE), en el 2021 los casos reportados ascendieron nuevamente a 1247. En el 2022, se registraron 846 casos que abarcan todo el territorio nacional, siendo la provincia de Morona Santiago la que reportó la mayoría de estos y Guayas con los 2 únicos casos de bartonelosis registrados. El último registro de la DNVE indica que para la semana 16 del presente año 2023 existen registrados 303 casos de leishmaniasis en el Ecuador, siendo la provincia de Pichincha la más afectada, con 70 casos registrados en todo el año. De estos casos 169 se les atribuyen a personas entre 20 a 49 años, 46 a mujeres y 123 a hombres (Dirección Nacional de Vigilancia

Epidemiológica, 2023). Es importante destacar que la bartonelosis, también conocida como fiebre de Oroya, verruga peruana o enfermedad de Carrión es endémica de Perú, pero varios casos ya se registran en países como Colombia y Ecuador (Gonzáles R. et al., 2007). Colombia no cuenta con un apropiado registro de casos de bartonelosis (Faccini-Martínez et al., 2017); sin embargo, en Ecuador la DNVE registró 2 casos de bartonelosis en el mes de diciembre del 2022 (Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2023).

El estudio de la microbiota de vectores artrópodos puede proporcionar una mejor comprensión sobre la biología de estos insectos y cómo se relacionan con su entorno (Ball & Armstrong, 2008; Rawat et al., 2023). Adicionalmente, este tipo de estudios puede influir en la capacidad de supervivencia del vector y su reproducción (Chala & Hamde, 2021). Por lo tanto, investigar la microbiota puede brindar información valiosa para el diseño de tácticas de regulación de estos insectos, incluyendo el descubrimiento de métodos que puedan ser empleados para controlar o reducir su población (Chala & Hamde, 2021; Wilson et al., 2020).

Existen diversos análisis sobre la microbiota de los flebótomos, particularmente del género *Lutzomyia* ya que varias de sus especies guardan estrecha relación con enfermedades como leishmaniasis y bartonelosis. Con base a lo mencionado, Monteiro et al. (2016) tuvieron como objetivo determinar la diversidad bacteriana de *Lutzomyia* spp. de un área endémica en Brasil, mediante el uso del secuenciador de Illumina HiSeq. Como resultado, se identificaron géneros bacterianos que las distintas especies de *Lutzomyia* compartían: *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum* y *Pseudomonas*, al igual que 2 familias: Proteobacteria y Actinobacteria. Adicionalmente, Kelly et al. (2017) analizan posteriormente la relación entre la microbiota intestinal del vector *Lutzomyia longipalpis* sugiriendo la posibilidad de que éste beneficia el crecimiento de *Leishmania* en estos vectores. En este estudio la familia Acetobacteraceae sumaba el 78% de la microbiota analizada en vectores infectados, sin embargo, en vectores que tenían dieta controlada representaba solo el 33%. Adicionalmente, la familia Actinobacteria fue detectada, pero en porcentajes mayores entre flebótomos infectados que en los no infectados. Otras familias que se observaron en gran cantidad fueron Rhizobiaceae, Tsukamurella, Trabuciella. En este estudio no se especificó el tipo de secuenciación utilizado.

Telleria et al. (2018) realizaron una revisión sobre la microbiota en flebótomos de distintas regiones del planeta e indicaron su importancia como base para el desarrollo de métodos de bloqueo de transmisión de enfermedades como leishmaniasis. Se mencionó que la microbiota del flebótomo empieza en el suelo, donde este insecto crece y madura hasta su etapa larval e incrementa su variabilidad posteriormente de acuerdo con la dieta del flebótomo. Adicionalmente, en esta revisión se indica que la microbiota del flebótomo incluye en su mayoría los géneros *Ochrobactrum*, *Microbaterium*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Lysobacter*, *Acinetobacter*, *Rickettsia*, *Bacillus*. A pesar de no mencionar la técnica utilizada en cada estudio para la obtención de información, los rangos de fechas abarcaron los años 1996 al 2017. De la misma manera los flebótomos que formaron parte de estos estudios no solo eran del género *Lutzomyia*, sino también *P. papatasi*, *P. duboscqi*, entre otros. Vivero et al. (2019) a través del MiSeq de Illumina secuenció la microbiota de flebótomos *Lutzomyia evansi* adultos de Colombia y se encontró en mayor cantidad a proteobacterias. Adicionalmente, otros microorganismos encontrados fueron *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Bacillus*.

Hasta el momento, los estudios de la microbiota de flebótomos han sido realizados con técnicas de secuenciación limitadas como Sanger o Illumina; sin embargo, estudios realizados con secuenciación de tercera generación (TGS) en vectores son escasos. Entre los estudios realizados por Luo et al. (2021), con TGS en la microbiota en garrapatas *Ixodes*, se identificaron *Anaplasma* y *Coxiella* entre otros microorganismos. Así mismo, en el 2022 se realizó el estudio de Xu et al. (2022) en *Chrysomya megacephala* identificando *Wolbachia* en mayor cantidad.

Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios de secuenciación de tercera generación de la microbiota de flebótomos. Como se ha mencionado anteriormente por Ball & Armstrong (2008); Chala & Hamde (2021) y Wilson et al. (2020), comprender la microbiota de los vectores, como los flebótomos, contribuye al desarrollo de metodologías para el control de vectores y a la comprensión de los mecanismos inmunológicos de los mismos, lo que puede tener aplicaciones importantes en el campo de la salud.

Un análisis más detallado y con más información podría ayudar a revelar interacciones complejas entre la microbiota y el flebótomo y así entender el mecanismo de inmunidad utilizado por el insecto (Telleria et al., 2018). Sin embargo, los análisis de secuenciación de primera y segunda generación tienen sus limitaciones. Mientras que la secuenciación en tercera generación permite obtener información de todo el gen 16S rRNA debido a que su capacidad de lectura alcanza los 60000 bp (pares de bases) (van Dijk et al., 2018). Por lo antes mencionado el objetivo de este estudio fue determinar el perfil metagenómico basado en 16S bacteriano de los flebótomos *Lutzomyia trapidoi* y *L. hartmanni* obtenidos de las ciudades de San Miguel de los Bancos, Pedro Vicente Maldonado, Mashpi y Puerto Quito, mediante secuenciación masiva de tercera generación con la finalidad de identificar el perfil bacteriano de estos vectores de acuerdo al sitio al que pertenecen y analizar si representan un riesgo para la salud de las comunidades humanas que habitan en estas zonas.

2. Materiales y Métodos

Área de estudio y muestreo de flebótomos: Los flebótomos utilizados para el presente estudio fueron proporcionados por el Centro de Investigación en Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador (CIZ). Estos especímenes fueron recolectados en las parroquias de San Miguel de los Bancos, Pedro Vicente Maldonado, Mashpi y Puerto Quito en las áreas de bosque. De las muestras recolectadas se seleccionaron hasta 30 especímenes de las especies *Lutzomyia trapidoi* y *L. hartmanni* de cada una de las parroquias mencionadas. Se obtuvieron un total de 150 especímenes.

2.1 Extracción de ADN de flebótomos

Se realizó mediante método in-house basado en la técnica inicial de Golczer & Arrivillaga (2008) y las recomendaciones de Arrivillaga-Henríquez et al. (2017). Las muestras fueron remojadas por 24 horas con 25 ul de buffer de lisis (SDS al 0,5 %, sacarosa 200 mM, NaCl 100 mM, Tris 100 mM y EDTA 50 mM, pH 8,2 – 8,4) a 37ºC. Posteriormente, se trituró cada muestra con un mortero entomológico, se agregó 1 ul de proteinasa K y se incubó a 56ºC por 10 minutos. Finalizada la incubación, se añadió 25 ul de buffer de lisis, se incubó por 1 hora 50 minutos a 56ºC y después se incrementó la temperatura a 80ºC por 15 minutos más. Se añadió 5.1ul de acetato de sodio (solución 3M pH 5,25 a 4ºC) y se mantuvo en reposo a -20ºC por 1 hora. Posteriormente, se procedió a centrifugar por 15 minutos, 14000 rpm a 4ºC y se rescató el sobrenadante. Al sobrenadante se le agregó 90 ul de etanol absoluto de grado molecular y se dejó reposar por 24 horas a -20ºC. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a máxima velocidad en frío por 15 minutos, se descartó sobrenadante y al pellet se le añadió 50 ul de etanol absoluto y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos. Se procedió a centrifugar a máxima velocidad en frío por 5 minutos, se descartó el sobrenadante, se colocó nuevamente etanol absoluto 25ul e inmediatamente se centrifugó a máxima velocidad una vez más por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el tubo con el pellet se dejó reposar a temperatura ambiente (37ºC) hasta que se evaporó el etanol. Una vez obtenido el ADN en forma de pellet, se procedió a diluir el pellet en 35 ul de agua destilada ultrapura y se conservó a -80ºC.

2.2 Preparación de librerías y secuenciación

2.2.1 Ligación de adaptadores para la región 16S

El procedimiento se realizó según lo indicado en el protocolo de ONT "Ligation Sequencing 1D (SQK-LSK109)". Se elaboró una mezcla para una primera PCR utilizando, para cada reacción, 1X de DreamTaq Master Mix Thermo Scientific®, Primers OXO27F y OXO1942R (Tabla 1) 0,5 uM cada primer, 9ul de agua destilada ultrapura para PCR de Thermo Scientific® y 1 ul de ADN de la muestra. Las condiciones de ciclado fueron de 95ºC por 3 minutos para activación de la polimerasa, 95ºC por 30 minutos para la desnaturalización de las hebras de ADN, 50ºC por 30 segundos para la fase de hibridación, 72ºC por 1 minuto y 30 segundos para extensión y finalmente 72ºC por 5 minutos para la elongación final. Las condiciones fueron establecidas para 25 ul de mezcla y 30 ciclos. Los productos de esta primera PCR fueron verificados en gel de agarosa al 1,1% sometidos a electroforesis por 45 minutos y se descartaron los productos que no presentaron bandas visibles.

Tabla 1.- *Primers, con secuencia universal subrayada, para amplificación de ADN que codifica para la región 16S rRNA*

Primer	Oligo	SEQ
Forward	OXO27F	5'- TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3'
Reverse	OXO1492R	5'- ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCCGGTTACCTTGTTACGACTT-3'

Proveedor: Macrogen
Secuencias obtenidas de Huggins et al. (2022)

2.2.2 Purificación de los productos de PCR del 16S mediante perlas magnéticas y cuantificación de ADN

Las perlas magnéticas (ABM) a temperatura ambiente fueron sometidas a vórtex durante 30 segundos para homogeneizarlas. Posteriormente, en un tubo de 1,5 ml se colocó el producto de la ligación de adaptadores y las perlas magnéticas en una relación de 1:1,8 según indica el inserto. La mezcla se dejó reposar durante 5 minutos y luego se colocó en la gradilla magnética durante 5 minutos más. Se retiró el sobrenadante y se colocó etanol molecular al 70% frío durante 30 segundos y se retiró el sobrenadante. Se procedió a resuspender las perlas con ADN con 20ul agua destilada ultrapura, se mantuvo en reposo por 30 segundos y posteriormente se colocó en gradilla magnética por 5 minutos más. Se recuperó el sobrenadante con ADN purificado y se conservó a -80ºC. Finalmente, se procedió a cuantificar el ADN purificado utilizando el kit dsDNA HS de Qubit® según indica el inserto y con una cantidad de 198 ul de working solution y 2 ul de ADN por muestra. Las muestras fueron normalizadas una a una para obtener una concentración de 1 ng/ul.

2.2.3 Adaptación de código de barras

Las muestras fueron clasificadas de acuerdo con la especie de *Lutzomyia*, sexo y sito en que fueron colectados como indica la tabla 2 y se descartaron las muestras que no encajaban en el perfil indicado en la misma.

Tabla 2.- Muestras positivas a *Lutzomyia spp.* asignadas a códigos de barra (BC) de acuerdo con el sector donde fueron recolectadas, especie y sexo.

Sitio de recolección [a]	Especie	Sexo	Número de muestras	BC *
Mashpi	*L. trapidoi*	Hembra	16	7
Puerto Quito	*L. hartmanni*	Hembra	13	8
Pedro Vicente Maldonado	*L. trapidoi*	Hembra	12	9
San Miguel de los Bancos	*L. trapidoi*	Hembra	22	10
Puerto Quito	*L. trapidoi*	Macho	11	11

[a] *Hábitat bosque*
** BC (Código de barras)*

Usando el servidor de New England Biolabs (NEB Bio calculator), se calculó para cada código de barras que los pooles tengan entre aproximadamente 140 fmol de concentración. Posteriormente, los códigos de barras fueron añadidos según se indica en el protocolo Barcoding Expansion 1-12 (EXP-PBC001) mediante una segunda reacción de PCR. Se establecieron como condiciones de ciclado los siguientes parámetros: 95ºC por 3 minutos, 95ºC por 15 segundos, 62ºC por 15 segundos, 72ºC por 1 minuto 45 segundos y, finalmente, 72ºC por 2 minutos. Las condiciones fueron establecidas para 25ul de mezcla y 30 ciclos. Posteriormente, los productos fueron purificados con perlas magnéticas (usando el protocolo anteriormente indicado) y se realizó un pool final, mismo que fue incubado en termociclador por 5 minutos a 20ºC y 5 minutos más a 65°C. Finalmente, el producto fue purificado y cargado en una Flow CelL R9.4.1 (FLO-MIN106D con 512 nanoporos) de acuerdo a lo indicado en el protocolo. Los datos se acumulan con el tiempo a medida que los nanoporos secuencian el ADN. La secuenciación se llevó a cabo por 48h (recomendado por la casa comercial para secuenciar amplicones) empleando el algoritmo de Super Accuracy Base Calling (HAC). Se generaron archivos de lectura individuales y que posteriormente serían analizados.

2.3 Análisis de datos

Los datos registrados en el MinION fueron analizados en el programa EPI2ME siguiendo el flujo de trabajo establecido para 16S, que permite la identificación bacteriana basada en secuencias con BLAST. Una vez cargadas las lecturas en el software se establecieron los siguientes parámetros, Split barcode: yes; Rango: 1350-1650 (10% $\pm$ el tamaño del amplicón esperado); Identidad mínima 95% (según la capacidad de resolución del MiniOn); Cobertura mínima: 85%; Secuencias blanco = 5 y una carga de aproximadamente 1200000 lecturas.

3. Resultados

De un total de 150 muestras de flebótomos seleccionados para la extracción de ADN y ligación de adaptadores 16S, 84 muestras fueron positivas al revelado por gel de agarosa (Figura 1) y 74 muestras fueron escogidas para los barcodes de acuerdo con las variables previamente mencionadas en la tabla 2.

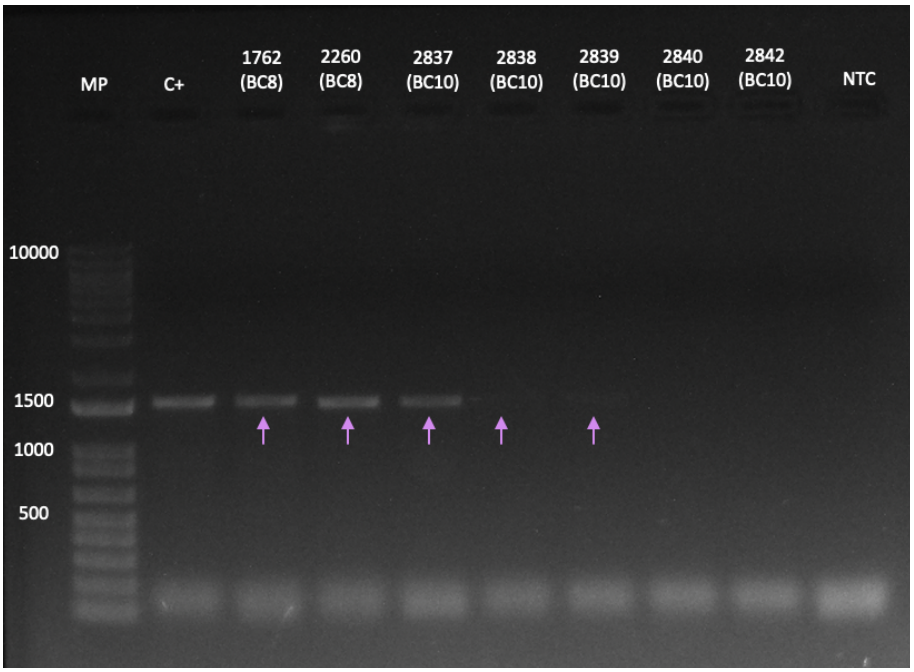


Figura 1. Resultado representativo de productos de PCR del 16S. MP: Marcador de peso molecular, C+: Control positivo, 1762-2842: Productos de PCR de muestras de flebótomo y su respectivo código de barras, NTC: Control sin ADN, Flechas violeta: Bandas visibles en gel considerados como resultados positivos para amplificación de la región blanco.

La secuenciación reveló un total de 25000 lecturas válidas entre los BC7-BC11. Como secuencias a considerar para el análisis, se seleccionaron solo aquellas con límite mínimo de abundancia (cut off) 1% con respecto a las lecturas globales. El análisis metagenómico bacteriano empleando el workflow 16S del EPI2ME reveló tres filos (Bacillota o Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria), 10 géneros y 13 especies. Aproximadamente el 70% de las bacterias identificadas son gram negativas, mientras que sólo 4 especies de 2 géneros fueron identificadas como gram positivas (Figura 2).

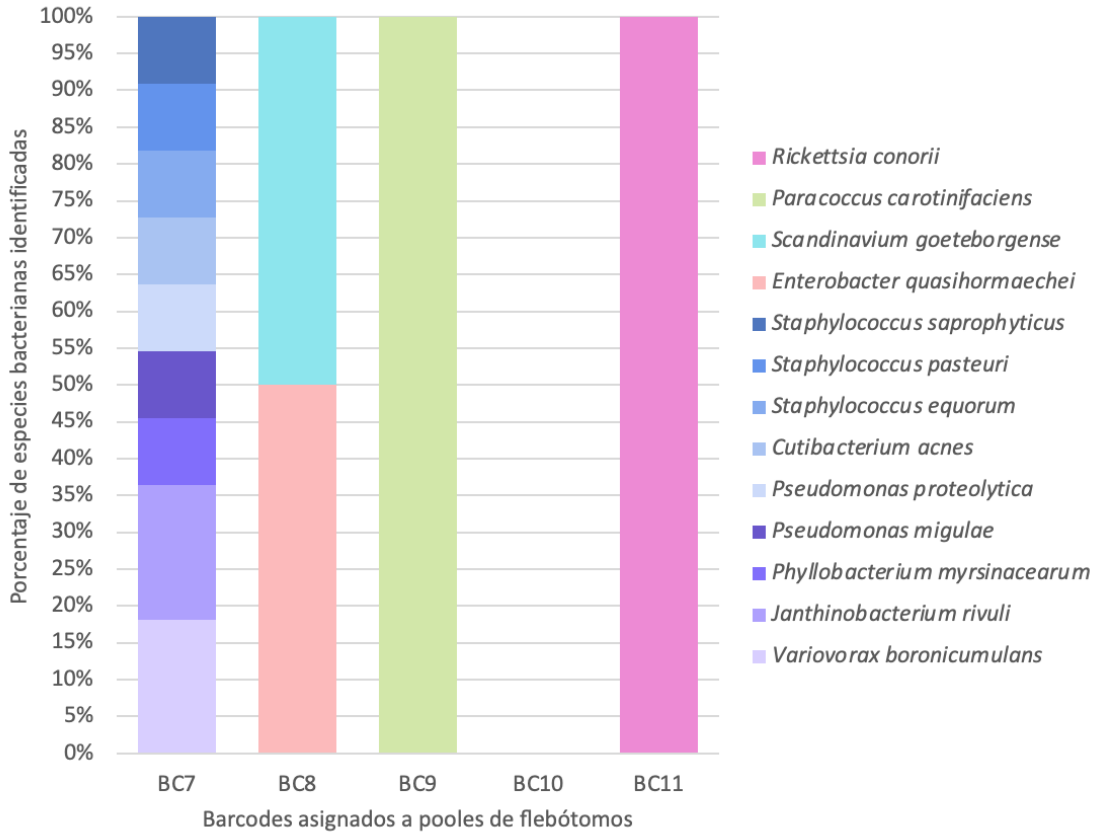


Figura 2. Diversidad y abundancia de especies bacterianas. Códigos de barras (BC7-BC11) designados a flebótomos obtenidos en Mashpi, Puerto Quito, Pedro Vicente Maldonado y San Miguel de los Bancos.

La diversidad y abundancia de la microbiota de los flebótomos variaron según las características de cada BC (código de barras). El grupo de *L. trapidoi* hembra de Mashpi (BC7) presentó mayor diversidad de la microbiota, siendo el género *Staphylococcus* el más abundante y representando el 33% de bacterias identificadas en este grupo. Por otra parte, el BC8 presentó únicamente dos géneros bacterianos (*Enterobacter* y *Scandinavium*), en la misma proporción de 50%. Adicionalmente, los BC9 y BC11 presentaron un único género bacteriano (*Paracoccus y Rickettsia*, respectivamente). Curiosamente, la abundancia bacteriana del BC10 fue nula, a pesar de que se registró presencia de 16S tanto en gel de electroforesis como en la cuantificación de los productos que fueron utilizados para el respectivo pool (Figura 3).

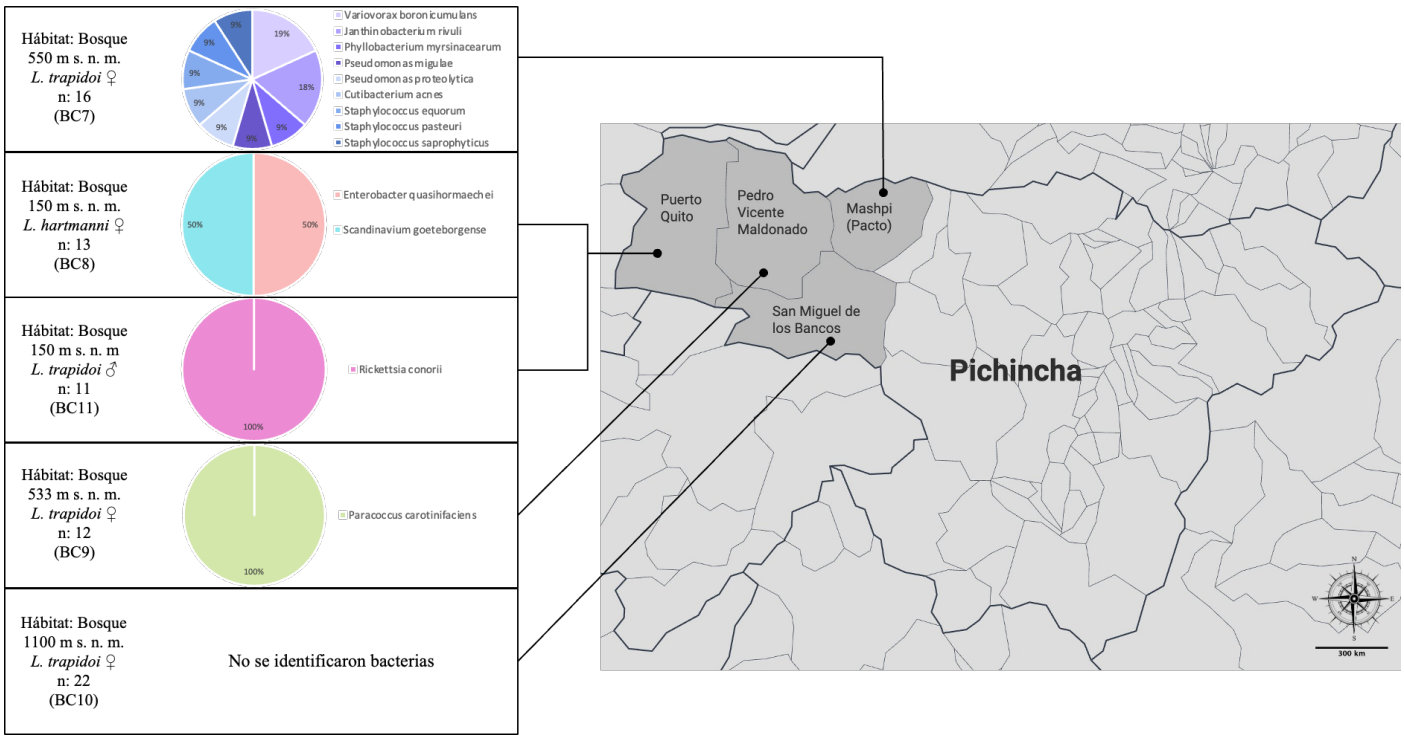


Figura 3. Perfil metagenómico de 16S de especies de *Lutzomyia* basado en el área. En colores se destacan los diferentes géneros y especies bacterianas. Se indica hábitat del flebótomo, altitud en metros sobre el nivel del mar (m s. n. m.), especie de flebótomo, sexo (♀ hembra, ♂ macho), número de muestras recolectadas (n) y el BC al que representan.

4. Discusión

La información obtenida sobre la microbiota de los flebótomos analizados revela la variabilidad de esta en función de la localización geográfica. Esto indica que la diversidad de bacterias identificadas puede ser atribuida a los factores ambientales característicos de cada zona donde los flebótomos fueron recolectados. De la misma manera, la presencia de tres distintos filos bacterianos, Bacillota o Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria, resulta un indicador de la heterogeneidad de la microbiota y de las posibles interacciones ecológicas de estos vectores.

Entre los resultados se destaca la predominancia del género *Staphylococcus* en el BC7 (*L. trapidoi* hembra), perteneciente a la localidad de Mashpi, situación que puede verse favorecida por las condiciones ambientales de esta zona en específico. Según Fraihi et al. (2017), la presencia de bacterias del género *Bacillus* y *Staphylococcus* son comunes entre poblaciones de flebótomos de distintas especies. Las bacterias de este género resultan patógenas para varios organismos y particularmente actúa como un control biológico para el flebótomo debido al gran potencial para colonizar su sistema digestivo (Robert et al., 1998; Wahba et al., 1999), sin embargo, varias especies de flebótomos también pueden llegar a su etapa adulta con bacterias de este género (Rogers and Backus, 2014. Existe evidencia que indica la presencia de *Staphylococcus spp*. en flebótomos *L. evansi*, *L. cruzi* y *L. longipalpis* recolectados en Brasil (Lange et al., 2015). A pesar de lo mencionado anteriormente, el flebótomo cuenta con un sistema inmunológico complejo que actúa diferente de acuerdo a la bacteria con la que interactúa (Heerman et al., 2015), por lo que el papel exacto de las especies de *Bacillus* y *Staphylococcus* en la biología y la respuesta inmune de los flebótomos aún no se comprende completamente y requiere más investigación.

Otras variadas bacterias identificadas en el BC 7 fueron *Pseudomonas migulae, Pseudomonas proteolytica, Phyllobacterium myrsinacearum, Janthinobacterium rivuli* y *Variovorax boronicumulans*. Estas bacterias se caracterizan por ser netamente ambientales, no patógenas y habitar entornos acuáticos, suelos y algunas plantas a nivel

de sus raíces (Miwa et al., 2008; Hardie et al., 2020; Lu et al., 2020). La presencia de este tipo de bacterias en el flebótomo puede deberse a la estrecha relación que existe entre el suelo y las etapas tempranas del ciclo de vida de este vector. Las *Pseudomonas*, se caracterizan por habitar suelos y el intestino de algunos animales y en vectores puede desempeñar un papel importante en la degradación de proteínas y largas cadenas de aminoácidos (Hardie et al., 2020). Estas bacterias cuentan con un mecanismo metabólico diverso lo que les permite adaptarse a variados entornos y condiciones, así como, el intestino del flebótomo. Por otra parte, la bacteria *Janthinobacterium rivuli*, se conoce por tener pigmentos con propiedades antimicrobianas y competir con otros microorganismos (Lu et al., 2020), lo cual podría potenciar el sistema inmune del flebótomo. Esta última bacteria, en conjunto con la *Variovorax boronicumulans*, desempeñan el rol de degradar compuestos orgánicos lo cual podría resultar beneficioso en caso de que estos vectores se alimentasen y requieran procesar los nutrientes consumidos (Miwa et al., 2008). Tomando en cuenta que las muestras de flebótomos fueron recolectadas en el bosque de la región de Mashpi a 550 metros sobre el nivel del mar, se puede considerar que algunos de estos vectores estuvieron en contacto con arroyos o ríos y variadas plantas en las que adquirieron las bacterias *Janthinobacterium rivuli* y *Phyllobacterium myrsinacearum* respectivamente. Sin embargo, también se identificó la bacteria anaeróbica *Cutibacterium acnes*, conocida únicamente por formar parte de la microbiota cutánea del ser humano (Dréno et al., 2018). La presencia de *C. acnes* en los resultados del BC7 puede deberse a que algún flebótomo de este grupo haya entrado en contacto con un individuo, posiblemente alimentándose de él.

Se identificaron diferencias en la composición bacteriana de flebótomos *L. hartmanni* hembras (BC8) y *L. trapidoi* machos (BC11), ambas especies recolectadas en un bosque situado a 150 metros sobre el nivel del mar en Puerto Quito. Considerando que ambos grupos difieren tanto en especie como sexo, es importante destacar que existe evidencia de la diferencia en los patrones hormonales, actitudinales y perfil matabólico de *Lutzomyias* hembras y machos (Sierra A. et al., 2000; Hamilton, 2022). Estos podrían representar factores que influyen en la composición de la microbiota de estos vectores, a pesar de pertenecer al mismo sitio geográfico.

Un 50% de las lecturas del grupo perteneciente al BC8 resultaron ser *Enterobacter quasihormaechei*. Esta bacteria se encuentra en entornos variados como el suelo, agua y el aparato digestivo de distintos organismos como animales y seres humanos. A pesar de ser una bacteria mayormente ambiental, la *E. quasihormaechei* puede ser encontrada también en el entorno hospitalario, relacionándose con enfermedades respiratorias y de vías urinarias (Wang et al., 2020). Por otra parte, el 50% restante está representado por la bacteria *Scandinavium goeteborgense*, perteneciente también a la familia Enterobacteriaceae. Los primeros registros de esta bacteria se remontan al año 2019, en la que se la aisló a partir de la muestra de una herida infectada. Ambas bacterias identificadas en el BC8 son actualmente investigadas debido a la presencia de genes resistentes a antibióticos, lo cual representa a futuro una amenaza a la salud global (Marathe et al., 2019).

Con respecto a las lecturas del BC11, se identificó a la bacteria *Rickettsia conorii* en un 100%. Esta bacteria es conocida por ser causante de la Fiebre Botonosa Mediterránea, también llamada Tifus de la Garrapata (Kelly el at., 2010). El vector y principal portador de la *R. conorii* es la garrapata *Rhipicephalus*, misma que contrae la bacteria de un animal infectado y la transmite a un nuevo hospedador mediante el contacto de su saliva a través de la picadura. No existe evidencia literaria de *Rickettsia conorii* formando parte de la microbiota de flebótomos, por lo que la presencia de esta bacteria en muestras de *L. trapidoi* machos resulta un hallazgo inusual y resalta la necesidad de investigar a profundidad la relación entre esta bacteria y otros vectores distintos a la garrapata *Rhipicephalus*. Una posible explicación al hallazgo de *R. conorii* en machos *L. trapidoi* puede estar relacionada a la transmisión a través de las hembras de flebótomos *Lutzomyia*, a pesar de no ser una vía de transmisión frecuente. Durante el ciclo de reproducción del flebótomo hembra, este se alimenta de la sangre de varios animales e individuos, sin embargo, al finalizar el período reproductivo el flebótomo hembra se alimenta de sustancias vegetales, mismas que resultan ser fuente de alimento para los flebótomos macho (das Virgens et al., 2015). El flebótomo hembra puede llegar a contraer la bacteria *R. conorii* si es que se llega a alimentar de un hospedador infectado y posteriormente infectar a un flebótomo macho al momento de compartir alimentos de origen vegetal. En el estudio de Anderson & Karr (2001), se indica que las bacterias del género *Rickettsia* y *Wolbachia*, ambas del mismo orden Rickettsiaceae, pueden potenciar el ciclo de vida de los vectores donde se hospedan y favorecer su transmisión vertical entre estos. Ashour & Othman (2020) concuerdan con lo mencionado y añaden que estas bacterias incrementan la predisposición del flebótomo a adquirir patógenos como la *Leishmania* y así también la transmisión horizontal de este protozoario hacia hospedadores mamíferos o humanos. Por otra parte, tomando en consideración que la bacteria *R. conorii* se reproduce en el intestino de su hospedador, existe la posibilidad de que un animal infectado haya eliminado sus desechos biológicos cerca del hábitat del flebótomo. Consecuentemente, el flebótomo pudo haberse aproximado a esta materia orgánica en descomposición para alimentarse de la misma, contrayendo así la bacteria.

La lectura de las muestras de *L. trapidoi* hembra recolectadas en un bosque de Pedro Vicente Maldonado, localizado a 533 metros sobre el nivel del mar y representadas por el BC9 dieron como resultado un 100% de *Paracoccus carotinifaciens*. Esta bacteria se caracteriza por su afinidad a ambientes naturales, habitando suelos y entornos acuáticos (Mussagy et al., 2023). De esta manera se podría deducir que los flebótomos recolectados

seguramente adquirieron la bacteria durante sus etapas tempranas de vida, mismas que ocurren bajo el suelo, así como, durante la etapa adulta al momento de acercarse a fuentes de agua como ríos o arroyos (Sierra A. et al., 2000).

El alto porcentaje de bacterias gram negativas identificadas entre los grupos de flebótomos podría estar relacionado con las funciones que este tipo de bacterias desempeñan en el intestino de estos vectores (Ashour & Othman, 2020). Muchas de las bacterias identificadas en los diferentes grupos de flebótomos *Lutzomyia* recolectados son consideradas netamente ambientales y pudieron ser adquiridas durante el contacto que tiene el flebótomo a lo largo de su ciclo de vida con entornos como el suelo, agua y vegetación. El aporte de bacterias gram negativas se relaciona con el metabolismo de los flebótomos, digestión de alimentos, así como también regulación del sistema inmune y protección contra patógenos (Telleria et al., 2018). Sin embargo, otras bacterias gram negativas no ambientales, como las del género *Rickettsia*, se ven involucradas en el aumento de la capacidad vectorial del flebótomo.

Con respecto al grupo de *L. trapidoi* hembra de San Miguel de los Bancos recolectados a 1100 metros sobre el nivel del mar y representados por el BC10, no se identificó bacteria alguna formando parte de la microbiota de este grupo de flebótomos. Durante el proceso de amplificación del 16S y su respectiva verificación en gel de agarosa, las muestras resultantes como positivas fueron seleccionadas para conformar el BC10. Sin embargo, la presencia de bandas en el gel de agarosa puede deberse a la amplificación de segmentos de ADN de peso molecular similar al del 16S (~1500 bp) que, debido a no ser compatible con el protocolo de secuenciación utilizado en este estudio, como resultado no se obtuvo registro de bacterias.

Es necesario tomar en consideración que el número total de muestras iniciales recolectadas, 150 flebótomos, se vio disminuido en un 56% debido a que no se obtuvieron resultados positivos en gel de agarosa posterior a la amplificación del 16S y ligación de adaptadores. Esto pudo deberse a varios factores como el método de extracción de ADN y la cantidad de muestra utilizada para amplificar la región 16S, entre otros. El método de extracción utiliza un buffer de lisis en el que las muestras reposan durante 24 horas para destruir su exoesqueleto (Cabrera et al., 2002), sin embargo, el flebótomo es un pequeño y el buffer de lisis podría degradar el ADN bacteriano durante el remojo. Futuros análisis podrían ser realizados utilizando kits de extracción de ADN de insecto para asegurar la integridad del ADN. Con respecto a la amplificación de 16S fallida, puede deberse a que en el ADN extraído del flebótomo había demasiado ADN del vector en sí lo que pudo afectar el desempeño de los primers para adherirse al ADN blanco (Roux, 2009). Esto podría mejorar si es que en el ADN a utilizar se lo utiliza en una cantidad de 2ul o, a su vez, en una dilución de ½, lo que permitiría que los primers puedan encontrar el ADN blanco permitiendo así la amplificación de este.

Los hallazgos presentados en este estudio permiten evidenciar que diferentes localidades geográficas podrían influir directamente en la microbiota de vectores como los flebótomos. La interacción de estos vectores con el suelo y el ecosistema en que habitan también es indicador de las especies de bacterias ambientales de cada localidad. La mayor cantidad de bacterias detectadas corresponden a la localidad de Mashpi, cantón Pacto, misma que forma parte del Distrito Metropolitano de Quito. Esta es la localidad más cercana a la ciudad capital por lo que su interacción con esta podría ser motivo de movilización de bacterias de un sitio a otro. De la misma manera, la presencia de la bacteria *Paracoccus Carotinifaciens*, en Pedro Vicente Maldonado a una altura similar a la de Mashpi, podría indicar que las temperaturas y condiciones de estas localidades promueven tanto el crecimiento de flebótomos, como también el de bacterias ambientales relacionadas con el suelo, vegetación y entornos acuáticos. Por otra parte, el cantón Puerto Quito localizado a 150 metros sobre el nivel del mar y formando límite con la región costa del Ecuador, puede propiciar un entorno adecuado para el desarrollo del flebótomo a lo largo de su ciclo de vida. En el BC11, perteneciente a esta región, se identificó a *Rickettsia conorii*. Según Telleria et al. (2018), los flebótomos hembra en los que se han identificado especies de *Rickettsia* se encuentran relacionados con áreas de transmisión de Leishmaniasis en China, evidenciando la conexión entre diferentes perfiles de microbiota de flebótomos y la capacidad que tienen para transmitir enfermedades. Mencionado lo anterior, la presencia de *R. conorii* en *L. trapidoi* machos de Puerto Quito, indicaría que vectores hembra con la misma bacteria en su microbiota son también propensas a contraer *Leishmania* y podrían ser las causantes de los casos de Leishmaniasis registrados en Pichincha hasta la semana 16 del presente año 2023 (Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2023). Finalmente, la ausencia de información sobre bacterias en la localidad de San Miguel de los Bancos, ubicada a 1100 metros sobre el nivel del mar, puede deberse a la altitud de la zona en la que fueron recogidas las muestras. Un entorno de bosque más alto provocaría que las temperaturas no sean adecuadas para el correcto desarrollo del flebótomo durante su ciclo de vida.

Desde el punto de vista epidemiológico, analizar las especies bacterianas que forman parte de la microbiota del flebótomo, permite rastrear la propagación de enfermedades como leishmaniasis o bartonelosis. De la misma manera, podrían identificarse posibles reservorios de enfermedades que amenazan con la salud pública. Como se mencionó anteriormente, bacterias del género Rickettsia podrían potenciar la capacidad vectorial del flebótomo haciéndolo más propenso a infectarse de Leishmania y diseminar este protozoario mediante la picadura a otros organismos. Esto indica la posibilidad de transmisión horizontal o vertical y un punto de partida a nuevos estudios para comprender la interacción entre flebótomos, la ecología de estos vectores y su relación con la salud pública. Por este motivo, el

conocimiento de la microbiota del flebótomo resulta crucial para desarrollar estrategias para el control de este tipo de enfermedades, así como medidas de prevención.

El presente estudio analizó el gen de ADN 16S que codifica para ARNr 16S. Este gen contiene regiones que se han conservado a través del tiempo (V1-V9) por lo que resulta un medio para la identificación de microorganismos presentes en una muestra a nivel de especie (Fukuda et al. (2010). Sin embargo, a pesar de que el gen 16S puede proporcionar información detallada sobre géneros y especies bacterianas de la muestra analizada, el estudio de ARN permitiría obtener datos más precisos sobre las bacterias que están replicándose activamente dentro del vector. De la misma manera, el estudio de ARN sería crucial si se desea analizar también identificar la presencia de virus y otros agentes patógenos en estos vectores.

Por otra parte, el estudio de otros genes resulta útil, no solo para la identificación de agentes infecciosos, sino también para análisis filogenéticos de los mismos. Los resultados obtenidos permitirían identificar si, estos microorganismos presentes en las muestras analizadas pertenecen a las localidades en las que fueron recolectadas o fueron introducidos desde otros puntos geográficos e incrementando así el área de propagación de estos. Otros genes que permiten el estudio de microorganismos son el 18S, ITS (Internal Transcribed Spacer), gen CYTB, gen gltA y rpoB, entre otros. Considerando que el flebótomo es conocido como vector de *Leishmania*, el gen CYTB resulta fundamental para la detección de este protozoario en muestras de flebótomo.

5. Conclusiones

Se encontraron bacterias pertenecientes al filo Bacillota y cercanas al género *Bacillus*, así como, bacterias pertenecientes a los géneros *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, lo cual concuerda con lo mencionado en otras investigaciones sobre que estos géneros son los más abundantes.

La mayor cantidad de bacterias son de carácter ambiental y corresponden a entornos con los que el flebótomo interactúa a lo largo de su ciclo de vida. Muchas habitan entornos relacionados con el suelo y vegetación lo cual indicaría la adquisición de estas bacterias tanto en etapas tempranas del ciclo de vida del flebótomo, como en etapas adultas en las que el flebótomo se alimenta de sustancias vegetales.

Es posible que variables como la temperatura y altura influyan en la variabilidad de bacterias ambientales en las distintas localidades de estudio.

Se identificaron bacterias que no pertenecen a la microbiota natural del flebótomo por lo que se puede deducir que éste se encuentra en contacto con otros organismos como son animales y humanos.

Hay evidencia de bacterias patógenas para el ser humano que podrían estar ligadas al potencial vectorial del flebótomo y podrían explicar el alto número de casos de Leishmania en la provincia de Pichincha.

6. Recomendaciones

Como recomendación a futuro, se sugiere realizar una nueva secuenciación a partir de las muestras de ADN obtenidas de los flebótomos utilizando la Flow Cell R10.4.1 que genera datos con un nivel de exactitud del 99%. Esto permitiría poder registrar más información al momento que el dispositivo realiza el basecalling. De la misma manera se sugiere aumentar el número de muestras sobre todo en áreas donde se evidencia el contacto del flebótomo con el humano y en áreas donde bacterias patógenas fueron identificadas. Adicionalmente, se sugiere que las lecturas obtenidas en la secuenciación sean comparadas con bases de datos mediante otros programas informáticos en caso de que no todas las secuencias registradas por el MinION se encuentren disponibles en el NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Financiamiento/Fondos: Esta investigación recibió apoyo de la UISEK-Dii bajo el proyecto DII-P011617_2.

Agradecimientos: Centro de Investigación en Zoonosis (CIZ) perteneciente a la Universidad Central del Ecuador (UCE) por proveer las muestras para este estudio; Soledad Cisneros por los conocimientos impartidos y apoyo brindad y Dr. Juan Carlos Cazar de la Universidad Central del Ecuador (UCE) por otorgar el permiso respectivo para destinar tiempo laboral a este estudio mediante Oficio Nro. UCE-FCM-DEC-2023-0655-O.

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias citadas

Anderson, C. L., & Karr, T. L. (2001). Wolbachia: evolutionary novelty in a rickettsial bacteria. *BMC Evolutionary Biology*, *1*, 10. https://doi.org/10.1186/1471-2148-1-10

Arrivillaga-Henríquez, J., Enriquez, S., Romero, V., Echeverría, G., Pérez-Barrera, J., Poveda, A., Navarro, J. C., Warburg, A., & Benitez, W. (2017). *Aspectos ecoepidemiológicos, detección natural e identificación molecular de Leishmania spp. en Lutzomyia reburra, Lutzomyia barrettoi majuscula y Lutzomyia trapidoi*. https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3536

Ashour, D. S., & Othman, A. A. (2020). Parasite–bacteria interrelationship. *Parasitology Research*, *119*(10), 3145–3164. https://doi.org/10.1007/s00436-020-06804-2

Ball, S. L., & Armstrong, K. F. (2008). Rapid, one-step DNA extraction for insect pest identification by using DNA barcodes. *Journal of Economic Entomology*, *101*(2), 523–532. https://doi.org/10.1603/0022-0493(2008)101[523:rodefi]2.0.co;2

Benallal, K. E., Garni, R., Harrat, Z., Volf, P., & Dvorak, V. (2022). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Maghreb region: A systematic review of distribution, morphology, and role in the transmission of the pathogens. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *16*(1), e0009952. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009952

Cabrera, O. L., Munsterman, L. E., Cárdenas, R., Gutiérrez, R., & Ferro, C. (2002). Definición de las condiciones de temperatura y almacenamiento adecuadas en la detección de ADN de Leishmania por PCR en flebotominos [Definition of appropriate temperature and storage conditions in the detection of Leishmania DNA with PCR in phlebotomine flies]. Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud, 22(3), 296–302.

Centro Nacional de Epidemiologia, P. y C. de E. del M. de S. (2023). *Sala de Situación de Salud*. Perú a La SE 03 - 2023. https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/publicaciones/salas-de-situacion-semanal/

Cetin, H., & Ozbel, Y. (2017). Sand Flies and Their Control Methods. *Turkish Journal of Parasitology*, *41*(2), 102–113. https://doi.org/10.5152/tpd.2017.5296

Chala, B., & Hamde, F. (2021). Emerging and Re-emerging Vector-Borne Infectious Diseases and the Challenges for Control: A Review. *Frontiers in Public Health*, *9*. https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.715759

das Virgens, T. M., Rezende, H. R., de Souza Pinto, I., & Falqueto, A. (2015). Sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) from the Goytacazes National Forest and surrounding areas of southeastern Brazil. Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology, 40(1), 28–35. https://doi.org/10.1111/jvec.12129

Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2023). *Enfermedades Transmitidas por Vectores*. https://www.salud.gob.ec/gacetas-vectoriales-2023/

Dréno, B., Pécastaings, S., Corvec, S., Veraldi, S., Khammari, A., & Roques, C. (2018). Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV, 32 Suppl 2, 5–14. https://doi.org/10.1111/jdv.15043

El Sawaf, B. M., Ahmed, M. M., Faragallah, A. M., Georgi, J. M., & Kassem, H. A. (2022). Ultrastructural comparison and distribution of sensilla on male and female antennae of the sand fly Phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae): the vector of cutaneous leishmaniasis in Egypt. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, *83*(1), 40. https://doi.org/10.1186/s41936-022-00303-9

Faccini-Martínez, Á. A., Márquez, A. C., Bravo-Estupiñan, D. M., Calixto, O.-J., López-Castillo, C. A., Botero-García, C. A., Hidalgo, M., & Cuervo, C. (2017). Bartonella quintana and Typhus Group Rickettsiae Exposure among Homeless Persons, Bogotá, Colombia. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(11), 1876–1879. https://doi.org/10.3201/eid2311.170341

Fraihi, W., Fares, W., Perrin, P., Dorkeld, F., Sereno, D., Barhoumi, W., Sbissi, I., Cherni, S., Chelbi, I., Durvasula, R., Ramalho-Ortigao, M., Gtari, M., & Zhioua, E. (2017). An integrated overview of the midgut bacterial flora composition of Phlebotomus perniciosus, a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in the Western Mediterranean Basin. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(3), e0005484. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005484

Fukuda, Kazumasa & OGAWA, Midori & TANIGUCHI, Hatsumi & Saito, Mitsu. (2016). Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. Journal of UOEH. 38. 223-232. 10.7888/juoeh.38.223.

Gálvez, R., Montoya, A., Fontal, F., Martínez De Murguía, L., & Miró, G. (2018). Controlling phlebotomine sand flies to prevent canine Leishmania infantum infection: A case of knowing your enemy. *Research in Veterinary Science*, *121*, 94–103. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.10.008

Golczer, G., & Arrivillaga, J. (2008). Modificación de un protocolo estándar de extracción de ADN para flebotominos pequeños (Phlebotominae: Lutzomyia) Modification of a standard protocol for DNA extraction from smaller sandflies (Phlebotominae: Lutzomyia). In *Revista Colombiana de Entomología* (Vol. 34, Issue 2).

Gonzáles R., C., Ciro Maguiña, V., Felipe Heras, M., & Luis Conde-Salazar, G. (2007). Bartonelosis (Fiebre de la Oroya o Verruga Peruana) ¿Enfermedad ocupacional? In *Medicina y Seguridad del Trabajo* (Vol. 53, Issue 209). Instituto Nacional de Medicina y Seguridad del Trabajo. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0465-546X2007000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Hamilton, J. G. C. (2022). Sand fly sex/aggregation pheromones. In R. Ignell (Eds.) et. al., Sensory Ecology of Disease Vectors. Wageningen Academic Publishers.

Hardie, K. R., Mathee, K., Schweizer, H. P., Dietrich, L. E., Welch, M., de Kievit, T., Nguyen, D., Kivisaar, M., Dandekar, A. A., McDougald, D., & Winstanley, C. (2020). Pseudomonas 2019 meeting report. Journal of medical microbiology, 69(7), 924–927. https://doi.org/10.1099/jmm.0.001208

Heerman M, Weng JL, Hurwitz I, Durvasula R and Ramalho-Ortigao M (2015) Bacterial infection and immune responses in Lutzomyia longipalpis Sand Fly Larvae Midgut. Plos Neglected Tropical Diseases 9, e0003923

Huggins, L. G., Colella, V., Atapattu, U., Koehler, A. V, & Traub, R. J. (2022). Nanopore Sequencing Using the Full-Length 16S rRNA Gene for Detection of Blood-Borne Bacteria in Dogs Reveals a Novel Species of Hemotropic Mycoplasma. *Microbiology Spectrum*. https://doi.org/10.1128/spectrum.03088-22

Jones, L. A., Cohnstaedt, L. W., Beati, L., Terán, R., León, R., & Munstermann, L. E. (2010). New Records of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) from Ecuador. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, *112*(1), 47–53. https://doi.org/10.4289/0013-8797-112.1.47

Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, *22*(9), 439–445. https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.06.012

Kelly P., Emmanouil Angelakis, Didier Raoult (2010), Infectious Diseases (Third Edition): Chapter 176 - Rickettsia and rickettsia-like organisms, Mosby, Pages 1807-1816, ISBN 9780323045797, https://doi.org/10.1016/B978-0-323-04579-7.00176-3.

Kelly, P. H., Bahr, S. M., Serafim, T. D., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., Meneses, C., Kirby, J. R., Valenzuela, J. G., Kamhawi, S., & Wilson, M. E. (2017). The Gut Microbiome of the Vector Lutzomyia longipalpis Is Essential for Survival of Leishmania infantum. *MBio*, *8*(1). https://doi.org/10.1128/mBio.01121-16

Lange, C. C., Brito, M. A. V. P., Reis, D. R. L., Machado, M. A., Guimarães, A. S., Azevedo, A. L. S., Salles, É. B., Alvim, M. C. T., Silva, F. S., & Meurer, I. R. (2015). Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. *Veterinary Microbiology*, *176*(3–4), 382–388. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.024

Lantova, L., & Volf, P. (2014). Mosquito and sand fly gregarines of the genus Ascogregarina and Psychodiella (Apicomplexa: Eugregarinorida, Aseptatorina) – Overview of their taxonomy, life cycle, host specificity and pathogenicity. *Infection, Genetics and Evolution*, *28*, 616–627. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.021

Leonel, J. A. F., Vioti, G., Alves, M. L., da Silva, D. T., Meneghesso, P. A., Benassi, J. C., Spada, J. C. P., Galvis-Ovallos, F., Soares, R. M., & Oliveira, T. M. F. de S. (2020). DNA extraction from individual Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) specimens: Which is the method with better results? *Experimental Parasitology*, *218*, 107981. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107981

Lu, H., Deng, T., Cai, Z., Liu, F., Yang, X., Wang, Y., & Xu, M. (2020). Janthinobacterium violaceinigrum sp. nov., Janthinobacterium aquaticum sp. nov. and Janthinobacterium rivuli sp. nov., isolated from a subtropical stream in China. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 70(4), 2719–2725. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004097

Luo, J., Ren, Q., Liu, W., Li, X., Hong Yin, Song, M., Bo Zhao, Guan, G., Luo, J., & Liu, G. (2021). Micropathogen community identification in ticks (Acari: Ixodidae) using third-generation sequencing. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*, *15*, 238–248. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.06.003

Marathe, N. P., Salvà-Serra, F., Karlsson, R., Larsson, D. G. J., Moore, E. R. B., Svensson-Stadler, L., & Jakobsson, H. E. (2019). Scandinavium goeteborgense gen. nov., sp. nov., a New Member of the Family Enterobacteriaceae Isolated From a Wound Infection, Carries a Novel Quinolone Resistance Gene Variant. Frontiers in microbiology, 10, 2511. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02511

Maroli, M., & Khoury, C. (2004). Prevention and control of leishmaniasis vectors: current approaches. *Parassitologia*, *46*(1–2), 211–215.

Miwa, H., Ahmed, I., Yoon, J., Yokota, A., & Fujiwara, T. (2008). Variovorax boronicumulans sp. nov., a boron-accumulating bacterium isolated from soil. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 58(Pt 1), 286–289. https://doi.org/10.1099/ijs.0.65315-0

Mussagy, C. U., & Dufossé, L. (2023). A review of natural astaxanthin production in a circular bioeconomy context using Paracoccus carotinifaciens. Bioresource technology, 369, 128499. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128499

Narasimhan, S., & Fikrig, E. (2015). Tick microbiome: the force within. *Trends in Parasitology*, *31*(7), 315–323. https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.03.010

Organización Panamericana de la Salud. (2021). *LEISHMANIASIS: Informe epidemiológico de las Américas*. https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742

Rawat, N., Anjali, Shreyata, Sabu, B., Jamwal, R., Devi, P. P., Yadav, K., Raina, H. S., & Rajagopal, R. (2023). Understanding the role of insects in the acquisition and transmission of antibiotic resistance. *Science of The Total Environment*, *858*, 159805. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159805

Robert LL, Perich MJ, Schlein Y and Jacobson JL (1998) Bacillus sphaericus inhibits hatching of phlebotomine sand fly eggs. Journal of the American Mosquito Control Association 14, 351–352

Rodrigues, B. L., & Galati, E. A. B. (2023). Molecular taxonomy of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) with emphasis on DNA barcoding: A review. *Acta Tropica*, *238*, 106778. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106778

Rogers EE and Backus EA (2014) Anterior foregut microbiota of the glassy-winged sharpshooter explored using deep 16S rRNA gene sequencing from individual insects. PLoS ONE 9, e106215

Roux K. H. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. Cold Spring Harbor protocols, 2009(4), pdb.ip66. https://doi.org/10.1101/pdb.ip66

Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*, *2020*. https://doi.org/10.1093/database/baaa062

Sierra A., D., Vélez B, I. D., & Uribe S, S. (2000). Identificación de Lutzomyia spp. (Diptera: Psychodidae) grupo verrucarum por medio de microscopia electrónica de sus huevos. *Revista de Biología Tropical*, *48*(2–3), 615–622. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442000000200033&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Telleria, E. L., Martins-da-Silva, A., Tempone, A. J., & Traub-Csekö, Y. M. (2018). Leishmania, microbiota and sand fly immunity. *Parasitology*, *145*(10), 1336–1353. https://doi.org/10.1017/S0031182018001014

van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D., & Thermes, C. (2018). The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics*, *34*(9), 666–681. https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008

Vivero, R. J., Villegas-Plazas, M., Cadavid-Restrepo, G. E., Herrera, C. X. M., Uribe, S. I., & Junca, H. (2019). Wild specimens of sand fly phlebotomine Lutzomyia evansi, vector of leishmaniasis, show high abundance of Methylobacterium and natural carriage of Wolbachia and Cardinium types in the midgut microbiome. *Scientific Reports*, *9*(1), 17746. https://doi.org/10.1038/s41598-019-53769-z

Wahba MM, Labib IM and el Hamshary EM (1999) Bacillus thuringiensis var. israelensis as a microbial control agent against adult and immature stages of the sandfly, Phlebotomus papatasi under laboratory conditions. Journal of the Egyptian Society of Parasitology 29, 587–597

Wang, C., Wu, W., Wei, L., Feng, Y., Kang, M., Xie, Y., & Zong, Z. (2020). Enterobacter wuhouensis sp. nov. and Enterobacter quasihormaechei sp. nov. recovered from human sputum. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 70(2), 874–881. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003837

Wilson, A. L., Courtenay, O., Kelly-Hope, L. A., Scott, T. W., Takken, W., Torr, S. J., & Lindsay, S. W. (2020). The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *14*(1), e0007831. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007831

World Health Organization. (2022a). *Operational manual on leishmaniasis vector control, surveillance, monitoring and evaluation*.

World Health Organization. (2022b). *World Health Statistics 2022: Monitoring Health for the SDGs, sustainable development goals* (Vol. 1). https://www.who.int/data/gho/publications/world-health-statistics

Wu-Chuang, A., Hodžić, A., Mateos-Hernández, L., Estrada-Peña, A., Obregon, D., & Cabezas-Cruz, A. (2021). Current debates and advances in tick microbiome research. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, *1*, 100036. https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100036

Xu, W., Wang, Y., Wang, Y., Zhang, Y., & Wang, J. (2022). Diversity and dynamics of bacteria at the Chrysomya megacephala pupal stage revealed by third-generation sequencing. *Scientific Reports*, *12*(1), 2006. https://doi.org/10.1038/s41598-022-06311-7