



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de fin de Master titulado:

“Análisis metagenómico de la diversidad del microbioma bacteriano total de dípteros flebótomos del género *Lutzomyia* del noroccidente de Pichincha, Ecuador”

Realizado por:

Stephanie Lizethe Espín Arroba Ing.

Director del proyecto:

Juan-Carlos Navarro Castro PhD.

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, 28 marzo del 2024

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, **Stephanie Lizethe Espín Arroba**, ecuatoriana, con cédula de ciudadanía N° **1721714952**, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado 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.



Stephanie Lizethe Espín Arroba Ing.

C.I.: 1721714952

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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Navarro', with a horizontal line underneath.

Juan Carlos Navarro Castro, Ph.D

LOS PROFESORES INFORMANTES:

JOSE RUBÉN RAMÍREZ-IGLESIAS

ANDRÉS MANUEL HERRERA YELA

Después de revisar el trabajo presentado lo han calificado como apto para su defensa
oral ante el tribunal examinador.

Dr. José Rubén Ramírez-Iglesias

MSc. Andrés Manuel Herrera Yela

Quito, 28 de marzo de 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

Handwritten signature in blue ink that reads "Stephanie Espín Arz".

Stephanie Lizethe Espín Arroba Ing.

C.I.: 1721714952

Agradecimientos

A mis profesores Juan Carlos Navarro y José Rubén Ramírez por permitirme trabajar junto a ellos y ser parte de esta gran red de desarrollo de investigación. Gracias por su conocimiento, tiempo, paciencia y sobre todo por enseñarme. Gracias a esta Alma Mater, por su empeño en generar información científica y relevante para el país, sobre todo por permitirme crearla aquí.

A mis padres Pauli, Frank y mi hermano Gabriel, que no dudaron ni un segundo en apoyarme durante esta enriquecedora etapa. Por su espera, paciencia y ayuda, les quedo en deuda por todo su amor y su apoyo. A mis tíos Chris y Xavi que siguen siendo parte de mis historias. A mis abuelitos Rossi y Hery que aún se preocupan de mí. A mi novio Ronnie gracias por todo tu amor, tu tiempo y por compartir los viajes de regreso. A mi amigo Francisco por la preocupación y las risas, y a Juan por la nueva amistad que me deja esta maestría.

Análisis metagenómico de la diversidad del microbioma bacteriano total de dípteros flebotomos del género *Lutzomyia* del noroccidente de Pichincha, Ecuador

Stephanie Espín-Arroba¹, José Rubén Ramírez^{2,1}, Juan Carlos Navarro^{2,1*}

¹ Maestría en Biomedicina, Facultad Ciencias Salud, UISEK; stephanie.espin@uisek.edu.ec

² Grupo de Enfermedades Emergentes, Desatendidas, Eco epidemiología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK. Quito, Ecuador.

* Autor de Correspondencia: juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

Resumen:

El microbioma bacteriano en insectos es una mezcla de diversas especies, resultantes de la interacción de su entorno y su desarrollo fisiológico habitual. *Lutzomyia aclydifera* y *Lutzomyia reburra* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) se caracterizan por ser no antropofílicos y pertenecientes a una comunidad de vectores comunes en el noroccidente de Pichincha. De estos vectores se ha definido su composición bacteriana total con el fin de determinar su diversidad, y factores de abundancia como punto inicial para luego determinar su posible influencia en el vector. Utilizando metagenómica, barcoding y Secuenciación de Nueva Generación (NGS), se obtuvo la información genética de la región completa del 16S ribosomal como clave de clasificación taxonómica de la diversidad y cantidad del microbioma en las especies de *Lutzomyia*. La diversidad del bacterioma mostró una relación inversamente proporcional con la altitud, entre las localidades de Pacto/Mashpi con la menor altitud donde *L. aclydifera* hembras mostró un microbioma bacteriano más diverso y abundante respecto a otras localidades como Pedro Vicente Maldonado e incluso comparativamente con *L. reburra*. Se describió la abundancia característica de bacterias ubicuas de suelo y agua, así como también bacterias de importancia veterinaria y clínica para humanos.

Palabras clave: Metagenómica, 16S, NGS, MinION, *Lutzomyia*, secuenciación, microbioma, bacterioma.

Abstract:

The bacterial microbiome in insects is a mixture of various species, resulting from the interaction of their environment and their usual physiological development. *Lutzomyia aclydifera* and *Lutzomyia reburra* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) are characterized by being non-anthropophilic and belonging to a community of common vectors in the northwest of Pichincha. Their total bacterial composition has been defined in order to determine their diversity, and abundance factors as a starting point to later determine their possible influence on the vector. Using metagenomics, barcoding and Next Generation Sequencing (NGS), genetic information of the entire 16S ribosomal region was obtained as a key to taxonomic classification of the diversity and quantity of the microbiome in *Lutzomyia* species. The diversity of the bacteriome showed an inversely proportional relationship with altitude, among the localities of Pacto/Mashpi as the lowest altitude where *L. aclydifera* females showed a more diverse and abundant bacterial microbiome with respect to other localities such as Pedro Vicente Maldonado and even comparatively with *L. reburra*. The characteristic abundance of ubiquitous soil and water bacteria, as well as bacteria of veterinary and clinical importance to humans, was described.

Keywords: Metagenomics, 16S, NGS, MinION, *Lutzomyia*, sequencing, microbiome, bacteriome.

1. Introducción

Los insectos del género *Lutzomyia* o flebótomos (manta blanca en el argot común) son dípteros de la familia *Psychodidae*, conocidos por ser vectores de parásitos del género *Leishmania* que los adquieren desde hospedadores vertebrados mediante mecanismos alimentarios como la hematofagia (Rotureau, 2006). De estos, únicamente las hembras tienen la capacidad de alimentarse de sangre, tomar el parásito y multiplicar estos agentes patógenos para transmitirlos a un hospedador susceptible (De Oliveira et al., 2017). Este fenómeno de proliferación ocurre principalmente con *Leishmania* y diversas bacterias de relevancia en salud pública y animal (Harbach, 2007; Tabbabi et al., 2022).

La presencia de insectos del género *Lutzomyia* en territorio ecuatoriano está fuertemente relacionada con factores climáticos, localización geográfica y la situación del urbanismo (Duque et al., 2020). Se conoce de una dependencia a la temperatura ambiental, que influye en su ciclo reproductivo, la fecundidad y en sus comportamientos alimentarios (Agyekum et al., 2021). Gómez E. & Hashiguchi Y. (1991) describieron que en las ciudades de Guayaquil, Quito y Cuenca existió mayor densidad de flebótomos entre los meses de febrero a Julio con una temperatura promedio de 18°C y una humedad máxima de 80%. Respecto a la variable altitud, Gómez, Kato, & Hashiguchi (2014) señalan que la localización de *lutzomyias* se ha dado desde zonas bajas costeras hasta regiones andinas de hasta 2500 m, ampliando considerablemente la adaptabilidad en diversos pisos climáticos.

Para Ecuador, se ha reportado la presencia de *Lutzomyias* en al menos 20 provincias, referidas por infecciones parasitarias transmitidas por estos vectores. La mayoría de casos se han presentado en la parte costera y han incrementado hasta la zona andina debido a la extensión del uso de la tierra para la urbanización y actividad agrícola, además de la movilización humana y la cercanía con animales silvestres (Calvopiña et al., 2004). Como vectores más abundantes se han señalado a *Lutzomyia trapidoi*, *L. hartmanni*, *L. gomezi*, *L. panamensis* y *L. ayacuchensis* (Calvopiña et al., 2004; Arrivillaga-Henríquez et al., 2017); su cantidad depende tanto de la cobertura del bosque como de la preferencia y disponibilidad de hospedadores (Arrivillaga-Henríquez et al., 2017). En cuanto a nuestra primera especie de interés, *L. aclydifera* por su parte es mayormente encontrada en la provincia de Imbabura y se señalan diferentes preferencias alimentarias que excluyen a los humanos (Gómez, Kato, Mimori, et al., 2014). Por otro lado, la especie *L. reburra* se caracteriza por preferir alimentarse de animales mamíferos y ha sido encontrada en la provincia de Pichincha siendo de importancia eco epidemiológica ya que porta de manera natural parásitos de *Leishmania* (Duque et al., 2020).

La descripción del nicho geográfico de las *lutzomyias* permite relacionarlo con otros aspectos como la interacción con sus fuentes de alimento (Duque et al., 2020). Debido a esta relación se propicia la transmisión de microorganismos y se inicia un nido o ciclo de transmisión (Gómez et al., 2022), donde el insecto adquiere microorganismos desde reservorios con una infección activa. Luego en el intestino se alcanza su multiplicación (viral, bacteriana o parasitaria) para luego moverse y alojarse en glándulas salivales para ser liberados en nuevas picaduras a nuevos hospedadores durante la alimentación (Gómez et al., 2022).

El proceso de proliferación y almacenamiento del microbioma se desarrolla en el sistema digestivo del vector y juega un papel fundamental al facilitar su riqueza en especies diversas, particularmente porque muchos parásitos y bacterias encuentran al tejido digestivo como un medio para completar su desarrollo y residen en este por beneficio (Kelly et al., 2017). Dado a ello, en el intestino de los vectores pueden encontrarse asociaciones bacterianas transitorias o propias que colonizan la región intestinal (Mancini et al., 2018).

El microbioma bacteriano puede llegar a formar una simbiosis con el insecto e influir de tal manera que modula sus procesos fisiológicos, metabólicos e inmunitarios (Mancini et al., 2018). Las respuestas inmunitarias desde el tejido intestinal pueden provocar alteraciones en el epitelio, cambiar el pH, aumentar la producción de enzimas digestivas y moléculas antiparasitarias y desencadenar la reducción de la susceptibilidad a la colonización por parásitos (Yadav et al., 2015; Coon et al., 2014).

Para el caso de la infección de *Leishmania* en *Lutzomyia*, el parásito ha desarrollado un mecanismo adaptativo, mediante el cual se rodea de fosfoglicanos que le facilita anclarse a las células epiteliales y de esta manera evade la digestión por proteólisis (Rotureau, 2006). En conjunto con el microbioma intestinal, se genera competencia tanto por la adhesión en el tejido como por los nutrientes (Pires et al., 2017) y en presencia de bacterias de tipo *Serratia*, *Bacillus* o *Haemophilus*, pueden inducir la lisis del promastigote de *Leishmania* por la destrucción de estos fosfoglicanos. Lo contrario ocurre en presencia de bacterias como *Pseudozyma*, *Asaia* y *Orchobactrum* que contrarrestan la lisis de los fosfoglicanos y facilitan el anclaje del parásito (Monteiro et al., 2016).

Debido a la diversidad y abundancia bacteriana que se espera se encuentre en los insectos, se ha considerado la metagenómica como una herramienta de identificación taxonómica, que facilita identificar regiones genéticas amplias y complejas como el 16S (Finney et al., 2015). Esta porción genética, es una secuencia genotípica de tipo housekeeping que ha servido como marcador de identificación molecular (Janda & Abbott, 2007). La región 16S rDNA contiene una alta cantidad de información filogenética por su conservación en las regiones hiper variantes V1-V9 (Bukin et al., 2019), Este gen tiene características óptimas para usarse en secuenciación, respecto a su longitud e información disponible. Adicionalmente, bajo análisis bioinformático se puede llegar a estudiar distintos organismos por generación de árboles filogenéticos con construcciones de máxima similitud o bayesianos alcanzando porcentajes hasta del 90% de reconocimiento (Janda & Abbott, 2007).

La Secuenciación de Nueva Generación (NGS en inglés) ha tomado la posta en métodos moleculares para proporcionar información independiente de técnicas tradicionales como los medios de cultivo (Baker et al., 2003; Wensel et al., 2022) Esta metodología de secuenciación actúa en simultáneo sobre muestras múltiples y heterogéneas (Wensel et al., 2022) obteniendo una optimización en secuenciación con alto rendimiento. Adicionalmente, se ofrece una mayor cantidad de resultados complejos y robustos a un costo menor, sin dejar de lado la rapidez y la alta resolución de información para el área investigativa (Durazzi et al., 2021).

Para este tipo de ensayos, el NGS parte de amplicones, ARN o ADN completo de grandes longitudes de aproximadamente 10 Kb (Hu et al., 2021). En la metagenómica, la mayoría de las estrategias proponen el uso de millones de amplicones purificados que luego son convertidos en fragmentos secuenciables en la preparación de librerías (Hodkinson & Grice, 2015). Las librerías se componen por segmentos definidos en longitud e información de material genético con adaptadores oligoméricos en 5' y 3' (Hess et al., 2020).

Para estos fragmentos definidos, existen opciones de lectura que se basan en la complejidad y resolución final de la secuenciación. El punto diferenciador de la NGS, es que se enfoca en lecturas largas, a diferencia de la tradicional secuenciación por Sanger que trabaja secuencias cortas (Hu et al., 2021). La NGS se enfoca en características como la capacidad de resolución dependiente de la longitud de los fragmentos y la cobertura para su definición pues además de ser un fragmento completo y extenso, debe existir en alta cantidad para ser definido varias veces y ajustar de mejor forma a la secuencia real con una mayor precisión (Hodkinson & Grice, 2015).

La NGS puede trabajar en sistemas multiplexing para ampliar información taxonómica y proporcionar datos de abundancia relativa según el gen investigado (Bruno et al., 2015). Esto facilita el estudio de tipo barcoding que identifica múltiples especies de una sola muestra colectiva del ambiente o de un organismo (Taberlet et al., 2012). De forma directa, se tiene acceso a una clasificación mediante meta barcoding utilizando un gen codificante hipervarante de discriminación, como el 16S (Bruno et al., 2015).

Estudios metagenómicos con 16S bacteriano realizados por Monteiro et al. (2016) y Pires et al. (2017) en localidades de Brasil, concordaron que la diversidad bacteriana depende de las preferencias alimentarias de las *lutzomyias* y la distribución de estas fuentes en los nichos de los vectores. Observaron esta particularidad al encontrar un incremento de bacterias después de que las *lutzomyias* hembras se alimentaron de sangre. Estos hábitos alimentarios hacen del microbioma abundante, a diferencia de las *lutzomyias* que se alimentan de frutas y azúcar con un microbioma equilibrado y más homogéneo (Monteiro et al., 2016; Pires et al., 2017).

En 2017, Fraihi et al. describieron la composición del microbiota en especies de *Phlebotomus* en Túnez y su asociación con las variables climáticas. Factores como los meses de muestreo influyeron en la abundancia de las bacterias. Por ejemplo, en julio, el mes de transmisión activa de *Leishmania*, se reportan Proteobacterias como las más abundantes, mientras que en septiembre las mismas se muestran imperceptibles. Con esto se evidencia que la variación es altamente influenciada por la estación climática.

En Ecuador, se conoce que los cuadros clínicos de leishmaniasis cutánea se dan de forma menos severa en comparación con infecciones en Perú (Hashiguchi et al., 2018). Dada esta particularidad, se señala que la proliferación parasitaria podría estar inhibida por comunidades bacterianas que ejercen mecanismos de competencia que reducen la capacidad infectiva (Kelly et al., 2017). Sin embargo, el detalle de esta composición del microbioma en Ecuador aún no ha sido descrita, principalmente para las especies de *Lutzomyias* que se desarrollan en regiones con transmisión activa y endémica de leishmaniasis como ocurre en el Noroccidente de Pichincha.

La composición del microbioma en *Lutzomyias* puede estar ligada con las variaciones en la alimentación y la altitud. Bajo esta premisa se propuso analizar y caracterizar el microbioma total de las especies de *Lutzomyia aclydifera* y *Lutzomyia reburra* de las localidades de Pacto/Mashpi, Pedro Vicente Maldonado y San Miguel de los Bancos/Milpe localizados en el noroccidente de Pichincha, Ecuador, mediante metagenómica del 16S rADN, con la finalidad de obtener un primera evaluación de diversidad y abundancia bacteriana y, poder inferir a posteriori su influencia distintos parámetros de transmisión de *Leishmania* y otros patógenos bacterianos de importancia en el contexto One Health.

Nuestra hipótesis inicial apunta a que existe una caracterización particular y diferencias del microbioma entre las dos especies de *Lutzomyia* respecto a sus preferencias alimentarias, por sexo y por nivel altitudinal.

2. Materiales y Métodos

Muestras de *Lutzomyia* del noroccidente de Pichincha, Ecuador

En trabajo conjunto con el Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis CIZ de la Universidad Central del Ecuador, se obtuvo ejemplares de *Lutzomyia*, que fueron recolectados en los sectores de Milpe, Mashpi, Pacto, Pedro Vicente Maldonado y San Miguel de los Bancos del Noroccidente de Pichincha (Figura 1), durante los períodos de julio y agosto 2013 y mayo 2014. Estos fueron almacenados conservando una cadena de frío para preservar el material genético. Se contó con una total de 133 individuos descritos en la tabla 1. Los insectos fueron recolectados en un muestreo sistemático y estratificado de la región (Arrivillaga-Henríquez et al., 2017; Duque et al., 2020), siguiendo las localidades señaladas en la Figura 1 con las respectivas altitudes descritas en la Figura 2 y Figura 3.



Figura 1. Distribución del área de muestreo en el Noroccidente de Pichincha, en las localidades de Pedro Vicente Maldonado, Pacto/Mashpi, San Miguel de los Bancos/Milpe.

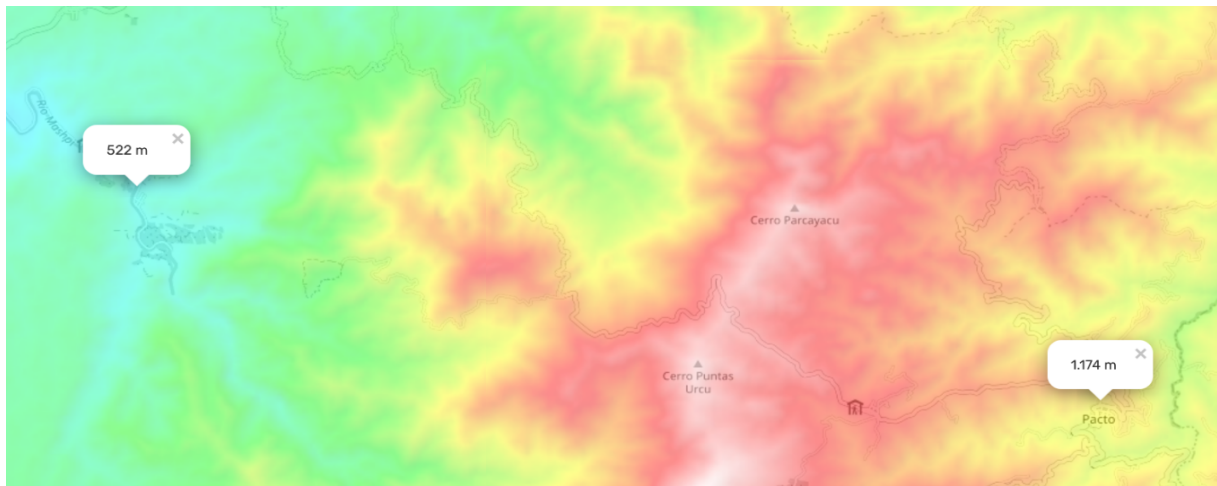


Figura 2. Altitud respecto a la región de muestreo para Pacto/Mashpi (Topographic-map, 2023)

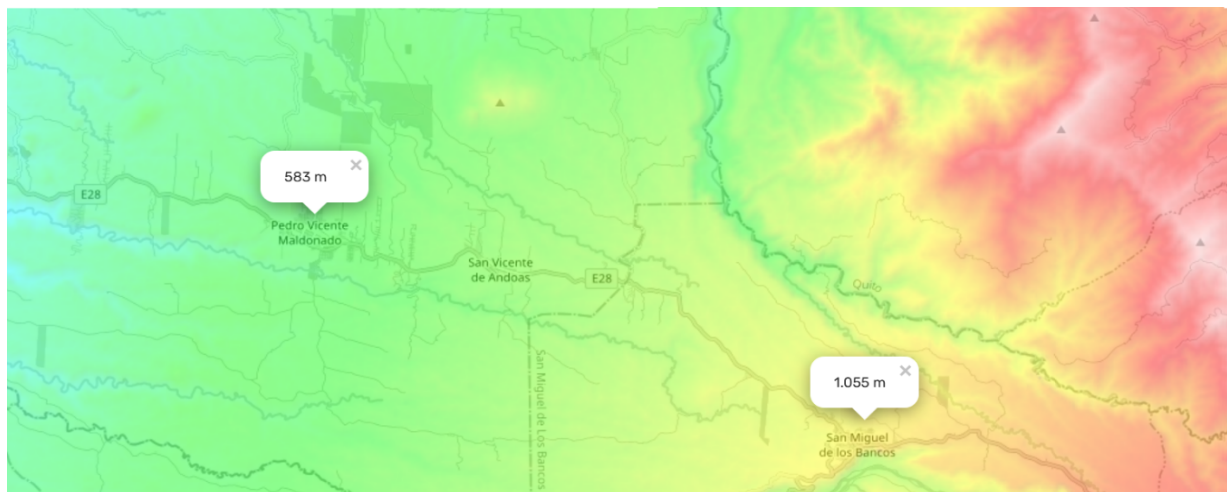


Figura 3. Altitud respecto a la región Pedro Vicente Maldonado y San Miguel de los Bancos/Mashpi (Topographic-map, 2023)

Tabla 1. Clasificación y conteo de las muestras de *L. aclydifera* y *L. reburra* hembras y machos localizados en Pacto/Mashpi, Pedro Vicente Maldonado y San Miguel de los Bancos.

Localidad	<i>Lutzomyia aclydifera</i>		<i>Lutzomyia reburra</i>		Total, por localidad
	Hembra	Macho	Hembra	Macho	
Pacto/Mashpi	4	26	3	10	43
Pedro Vicente Maldonado	8	22	Sin muestras	30	60
San Miguel de los Bancos/Milpe	Sin muestras		8	22	30
Total por sexo	12	48	11	62	133
Total	60		73		

Se utilizaron únicamente ejemplares completos, que no se encuentren rotos o lisados en la región abdominal para evitar contaminación cruzada y que hayan sido almacenados bajo el protocolo de recolección y almacenamiento aplicado por el instituto colaborador.

Extracción de ADN total de los insectos de *Lutzomyia*

Bajo condiciones estériles, se procedió a realizar una extracción con protocolo *in house* por sales de ADN. Un total de 133 ejemplares de *L. aclydifera* y *L. reburra* fueron embebidos completamente en 25uL de buffer de lisis con incubación a 37°C por 24h. Seguido de una lisis mecánica con mortero, se añadió 2 uL de proteinasa K y se llevó a incubación a 56°C por 10 minutos. Se añadió 25 uL de buffer lisis para completar el proceso con incubación por 1 hora y 50 minutos. La desactivación de la proteinasa K se llevó a cabo por incremento de temperatura a 80°C por 15 minutos. Se añadió 6uL de acetato de sodio frío a la solución de lisis, se incubó a -20°C por una hora. Para rescatar el sobrenadante se llevó a centrifugación a 12000 rpm por 15 minutos, se rescató el sobrenadante y se incubó con 100 uL de etanol 100% de grado molecular a -20°C por toda la noche (Golczer & Arrivillaga, 2008).

Se completó la extracción de ADN con lavados de etanol, y que fue centrifugada por 15 minutos a 12000 rpm. Luego, se descartó el sobrenadante y se añadió 50 uL de etanol puro y se incubó por 10 minutos a RT, seguida de centrifugación por 5 minutos. El último lavado con etanol, se colocó 25 uL de etanol absoluto frío sobre el pellet, seguido de una centrifugación por 15 minutos. El etanol fue evaporado a 37°C, para finalmente eluir el ADN en 40 uL de agua PCR ultra pura (Golczer & Arrivillaga, 2008).

Amplificación de la región 16S, preparación de librerías y secuenciación NGS

Por medio de PCR convencional, se amplificó la región completa de 16S rADN bacteriano con primers específicos y sus respectivos adaptadores OXO27F (5'- TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCAGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3') y OXO1492R (5'- ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCCGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Huggins et al., 2022). Las condiciones de PCR siguieron el siguiente protocolo: Desnaturalización a 95°C por tres minutos. 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, annealing a 50°C por 30 segundos y extensión a 72°C por un minuto y 30 segundos. para finalizar una espera a 72°C por cinco minutos.

Posterior a la amplificación del 16S rDNA, se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar tamaño e integridad del producto del amplicón. En consecuencia, los productos positivos de PCR fueron purificados con perlas magnéticas, cuantificados y almacenados a -80°C. Se leyeron concentraciones por fluorometría con el equipo Qubit 2.0® y el Kit dsDNA HS Quantification assay de ThermoFisher Scientific.

Para el etiquetado por Barcoding se transfirió en promedio 145 finol de ADN de 16S amplificado para cada grupo según la tabla 2, se ajustó el volumen a 48uL con agua libre de nucleasas seguido de homogeneización y una breve centrifugación. En el proceso de PCR de barcoding, para la reacción se añadió 2uL de PCR Barcode junto con 48 uL de DNA diluido, seguido de 50 uL del master mix Long Amp Taq 2x. Para el proceso de amplificación se comenzó con una desnaturalización de 95°C por tres minutos, 12 ciclos de amplificación que constan de: Desnaturalización a 95°C por 15 segundos, Annealing a 62°C por 15 segundos, y una extensión a 65°C. Finalmente un ciclo a 65°C. Se cuantificó y se continuó con el proceso (Oxford Nanopore Technologies, 2019).

Tabla 2. Distribución y clasificación de muestras respecto a la especie de *Lutzomyia*, sexo, y localización geográfica

	Región	<i>L. aclydifera</i>	<i>L. reburra</i>
		Barcode	Barcode
Hembras	Pacto/Mashpi	BC01	BC02
	Pedro Vicente Maldonado	BC03	Sin muestras
	San Miguel de los Bancos/Milpe	Sin muestras	BC04
Machos	Pedro Vicente Maldonado	BC05	BC06

Combinación de Variables: BC01: *L. aclydifera* hembras de Pacto/Mashpi. BC03: *L. aclydifera* hembras de Pedro Vicente Maldonado. BC05: *L. aclydifera* machos de Pedro Vicente Maldonado. BC02: *L. reburra* hembras de Pacto/Mashpi. BC04: *L. reburra* hembras de San Miguel de los Bancos/Milpe. BC06: *L. reburra* machos de Pedro Vicente Maldonado.

Cada solución de Barcode amplificada fue purificada por perlas magnéticas AMPure XP y cuantificada para continuar con la preparación de los extremos. En un tubo de PCR se colocó 1 uL de DNA muestra de control, junto con el ADN del protocolo previo, además de buffer de reacción Ultra II end prep y 3 uL mix de enzimas Ultra II End prep. La reacción tuvo una incubación de 5 minutos a 20°C y 5 minutos a 65°C (Oxford Nanopore Technologies, 2019).

El ADN pool fue purificado con perlas AMPure XP, los 60 uL de la reacción previa fueron mezclados con 60 uL de perlas, se mantuvo en homogeneización por cinco minutos a RT. El tubo de reacción se centrifugó y colocó sobre un imán para retirar el sobrenadante de las perlas y se añadió 200 uL de etanol 80% con agua libre de nucleasas, sin mover el pellet se retiró y descartó el etanol. Se repitió el proceso de lavado con etanol dos veces. Finalmente, el pellet se resuspendió en 61 uL de agua libre de nucleasas con una incubación de dos minutos a RT, se retiró la solución de elución y se separó de las perlas (Oxford Nanopore Technologies, 2019).

Para el proceso de ligado de los adaptadores, en un tubo de centrífuga de 1.5 mL se cargó 60 uL del DNA resultante del proceso previo, junto con 25 uL de buffer de ligación, 10 uL de Ligasa de DNA NEBNext Quick T4 y 5uL de Mix de adaptadores. Se dejó en incubación por 10 minutos a RT. Luego se añadieron 40 uL de perlas AMPure XP y se homogeneizó por rotación 5 minutos. Se llevó a centrifugar y se mantuvieron las perlas en el fondo con la ayuda de un imán mientras se descartó el sobrenadante. Se añadió 250 uL de buffer para fragmentos largos y se llevó al rack imantado para acumular las perlas en un pellet, se descartó el sobrenadante y se volvió a lavar (Oxford Nanopore Technologies, 2019).

Una vez seca las perlas sin sobrenadante, se añadieron 15 uL de buffer de elución, seguido de una precipitación con centrifuga y una incubación por 10 minutos a RT. Se retiraron los 15 uL de ADN con librería y se cuantificó para cargar en la célula de flujo una concentración de 5 o 50 fmol.

El proceso de secuenciación comenzó con la preparación de la célula de flujo con un mix cebador con 30 uL de Flush Tether en Flush buffer. En el equipo MinION™ se colocó la celda, se deslizó hacia el puerto cebador y se cargó 800 uL de mix cebador en la celda de flujo sin dejar burbujas de aire. Para la carga de las muestras, se mezclaron 37.5 uL de buffer de secuenciación con 25.5 uL de perlas de carga y 12 uL de la librería preparada anteriormente. En el puerto de muestra SpotON se cargaron 75 uL de la librería, asegurándose que entre el puerto de muestra. Se cerró el puerto de muestra SpotON y la tapa del MinION y se continuó con el protocolo de secuenciación en el equipo por 48 horas. (Oxford Nanopore Technologies, 2019).

Análisis taxonómico de las secuencias resultantes

Con el sistema de análisis de datos EPI2ME de Metrichore Ltd., bajo el flujo de trabajo Fastq 16S se clasificó por orden filogenético para familias, géneros y especies, según una longitud mínima de 1350 pb y máxima de 1650pb, una cobertura mínima del 85% e identidad máxima de 95%. Para el análisis de identidad con blast de tomó un mínimo de 5 secuencias target. El programa se ejecutó por 15 días y se dio lectura de las clasificaciones.

3. Resultados

Mediante la amplificación del gen 16S bacteriano de un total de 133 flebotominos, 116 especímenes resultaron positivos para la amplificación del gen completo, seleccionando las más relevantes por región en 22 hembras y 64 machos. Para la distribución y formación de librerías se distribuyó respecto a la

Tabla 3.

Un total de 14.400 lecturas fueron reconocidas respecto a los 6 barcodes en el programa EPI2ME y flujo de trabajo para 16S, con un 96% de precisión en la clasificación taxonómica. La mayor cantidad de lecturas fueron obtenidas del BC04 correspondiente a *L. reburra* hembras de la región de San Miguel de los Bancos/Milpe con 2.128 lecturas totales. El siguiente barcode fue BC01 de *L. aclydifera* de la región Pacto y Mashpi con 1.027 y en menor cantidad de lecturas se encuentran los demás barcodes como se muestra en la Figura 4.

En primera instancia se evaluó las diferencias respecto a la especie del vector y la composición del microbioma total (Figura 5) evidenciando al grupo de flebotomos de *L. aclydifera* con una comunidad de bacterias más

abundante y diversa en relación a *L. reburra*, que por su parte cuenta con menos recuento de lecturas y menor cantidad de géneros bacterianos (

Tabla 4). La diversidad de *L. aclydifera* fue claramente mayor que la de *L. reburra*, siendo *Sphingomonas* el género común entre las dos especies (Figura 5).

Se analizó la composición bacteriana de *L. aclydifera* según el sexo y la ubicación geográfica, utilizando los Barcodes BC01, BC03 y BC05 (Figura 6). Los ejemplares de *L. aclydifera* hembra de Pacto/Mashpi (BC01) mostraron mayor variabilidad con bacterias del género *Agrobacterium*, *Staphylococcus*, *Bradyrhizobium*, *Hyphomicrobium*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* y otros menos frecuentes que se encuentran descritos en la Tabla 5. En Pedro Vicente Maldonado (BC03) las bacterias predominantes son del género *Staphylococcus*, *Sphingomonas* y *Stenotrophomona*, que a su vez fueron encontradas en común con BC01.

Por contraparte, en *L. aclydifera* machos de Pedro Vicente Maldonado (BC05) se detectó *Acinetobacter*, *Cutibacterium* y *Sphingobium* (Figura 6). Se observó la relación entre hembras y machos de Pedro Vicente Maldonado mostrando similitud en la ocurrencia de *Acinetobacter* y *Cutibacterium*.

Con los barcodes BC02, BC04 y BC06, se identificó la composición de microbioma por sexo y región de *L. reburra* (Figura 7). En hembras de Pacto/Mashpi (BC02), los géneros predominantes fueron *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Aquabacterium*, *Methylobacterium*, *Methylorubrum*, *Pantoea*. Para hembras de San Miguel de los Bancos/Milpe (BC04) se identificaron géneros *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Rickettsia*, *Enterobacter* y *Caulobacter*. Para ambas localidades se encontró en común bacterias del género *Bradyrhizobium*.

En cambio, para las *L. reburra* macho de Pedro Vicente Maldonado (BC06) se encontraron *Caulobacter*, *Cutibacterium*, *Moraxella*, *Niallia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rosenbergiella*, *Sphingomonas* (Figura 7). Con este detalle, se identificó la presencia de *Pantoea* tanto en hembras como machos de dos localidades diferentes BC02 y BC06. Así como también la existencia de *Caulobacter*, compartida entre BC04 y BC06,

Las diferencias fueron evidentes respecto a cada región, resultado de una mezcla varia y bien marcada por cada una de las zonas evaluadas (Tabla 5).

Tabla 3. Clasificación de muestras con amplificación positiva de gen 16S completo respecto a localización geográfica, especie de *Lutzomyia* y cantidad de muestras disponibles.

	Región	<i>L. aclydifera</i>		<i>L. reburra</i>	
		No de muestras	Barcode	No de muestras	Barcode
Hembras	Pacto/Mashpi	4	BC01	3	BC02
	Pedro Vicente Maldonado	7	BC03	Sin muestras	
	San Miguel de los Bancos/Milpe	Sin muestras		7	BC04

Machos	Pedro Vicente Maldonado	18	BC05	22	BC06
---------------	--------------------------------	----	------	----	------

Tabla 4. Recuento de familias, géneros y especies del microbioma bacteriano entre las dos especies de flebótomos evaluados clasificados según taxonomía por EPI2ME.

	Familias		Géneros		Especies	
	específicas	comunes	específicas	comunes	específicas	comunes
<i>L. alydifera</i>	17	11	27	9	42	5
<i>L. reburra</i>	5		7		13	
Total identificado	33		43		60	

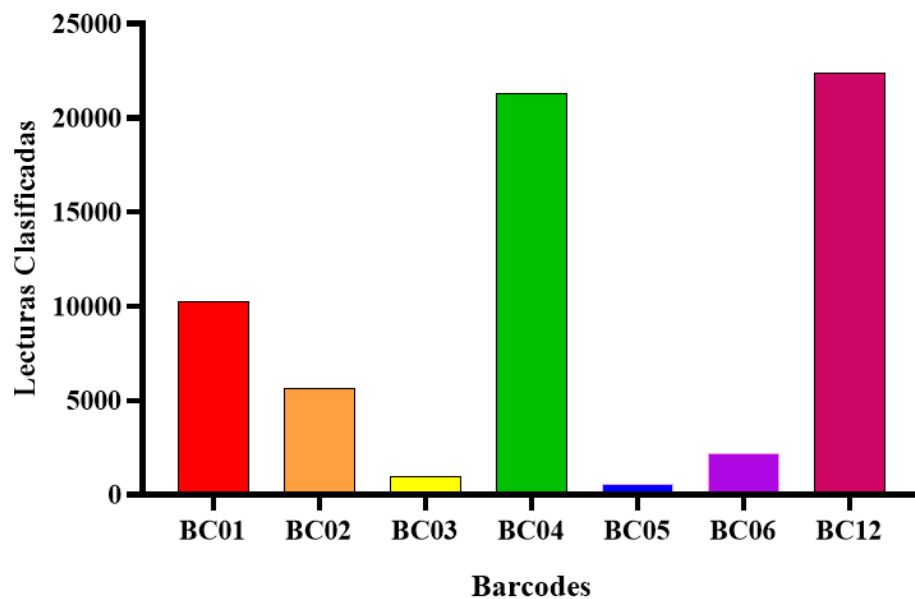


Figura 4. Clasificación por abundancia de lecturas finales con un 95% de identidad clasificadas post secuenciación respecto a cada Barcode. BC12: control positivo de secuenciación.

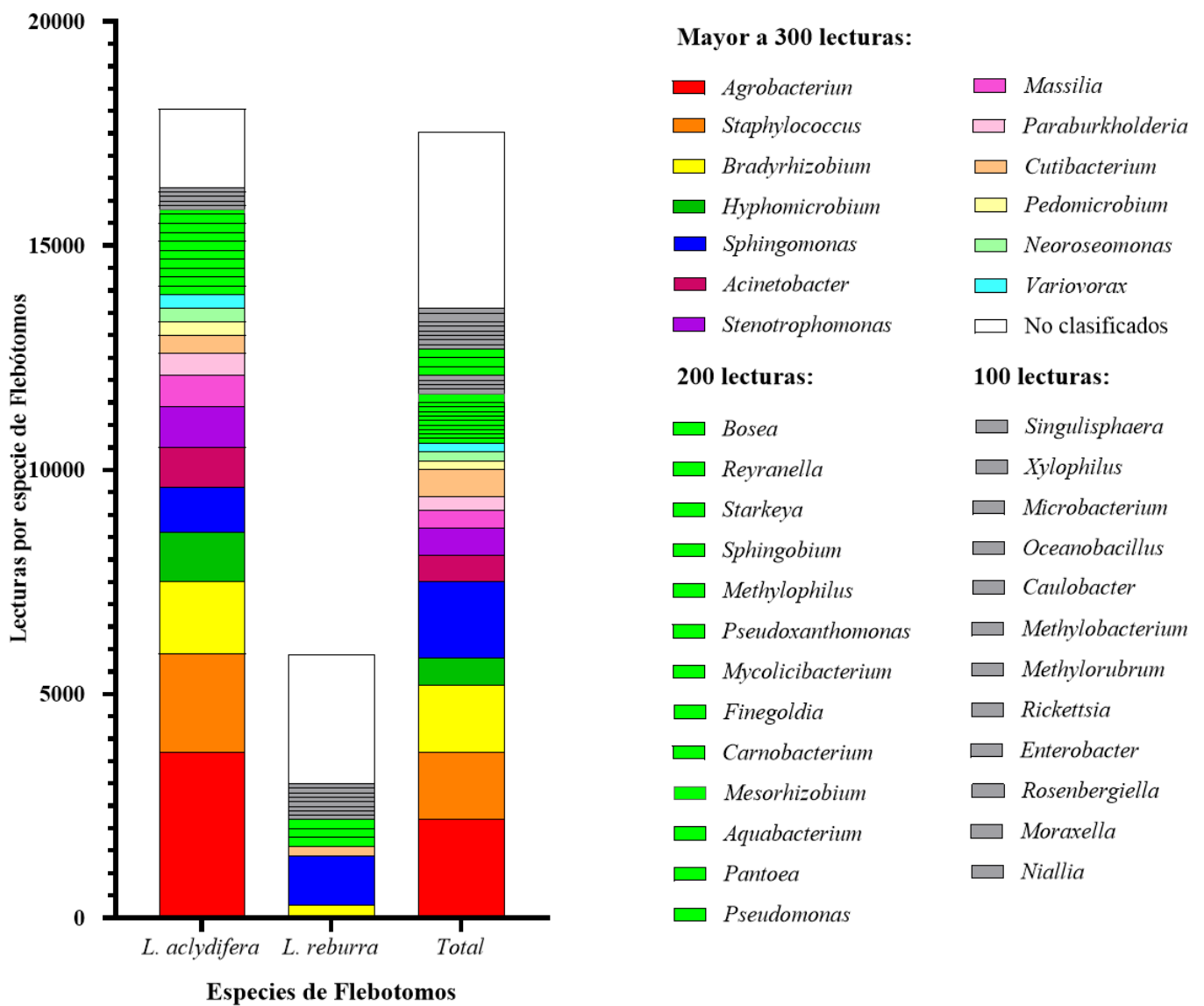


Figura 5. Clasificación taxonómica de microbioma de *L. aclydifera* y *L. reburra* respecto a la cantidad de lecturas totales por identidad con secuenciación en NGS Oxford Nanopore del gen completo de 16S bacteriano de la región de Pacto/Mashpi, Pedro Vicente Maldonado, San Miguel de los Banco/Milpe.

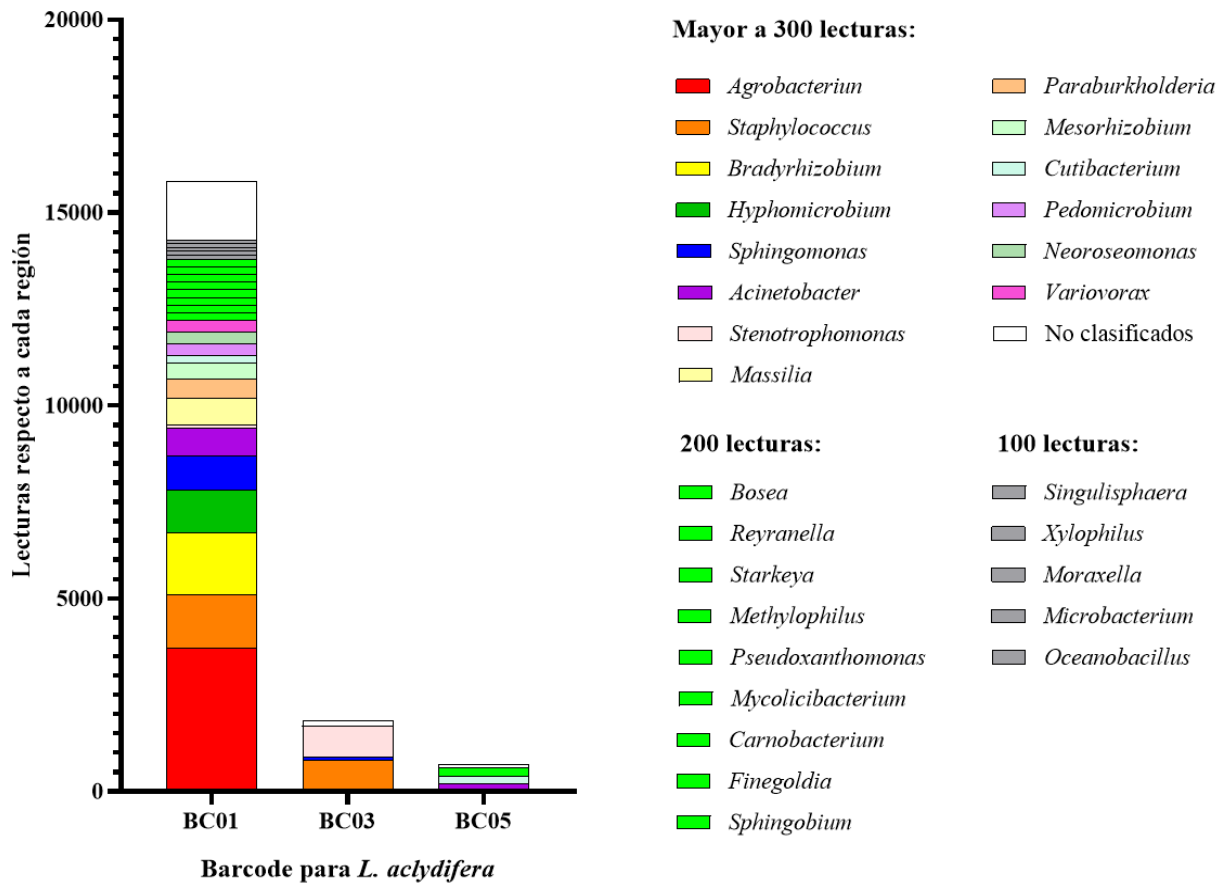


Figura 6. Clasificación taxonómica respecto a la cantidad de lecturas con 95% de identidad encontradas en *L. aclydifera* respecto al sexo y la región.

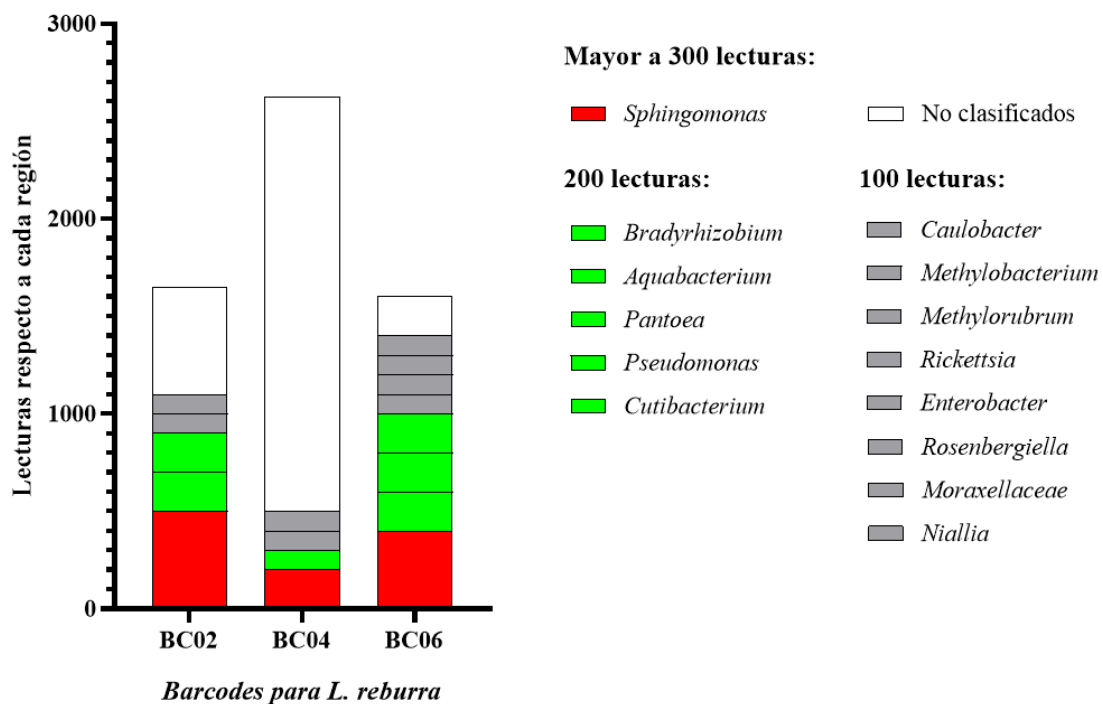


Figura 7. Clasificación taxonómica respecto a la cantidad de lecturas con 95% de identidad encontradas en *L. reburra* respecto al sexo y la región

Tabla 5. Descripción taxonómica por familia, género y especie de las bacterianas componentes del microbioma total encontradas en *Lutzomyia aclydifera* y *Lutzomyia reburra* respecto a su sexo y localización geográfica.

Clasificación taxonómica			<i>L. aclydifera</i> hembra		<i>L. aclydifera</i> macho	<i>L. reburra</i> hembra		<i>L. reburra</i> macho
Familia	Género	Especie	Pacto/Mashpi	Pedro Vicente Maldonado	Pedro Vicente Maldonado	Pacto/Mashpi	San Miguel de los Bancos/Milpe	Pedro Vicente Maldonado
<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	X					
		<i>Agrobacterium cavarrae</i>	X					
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X	X				
		<i>Staphylococcus equorum</i>	X					
		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	X					
		<i>Staphylococcus pasteurii</i>	X					
		<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	X	X				
<i>Nitrobacteraceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium mercantei</i>	X			X	X	
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Hyphomicrobium facile</i>	X					
<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas leidyi</i>	X					X
		<i>Sphingomonas echinoides</i>	X	X		X		X
		<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>					X	

		<i>Sphingomonas hankookensis</i>					X	
	<i>Sphingobium</i>	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>			X			
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	X		X			
		<i>Acinetobacter radioresistens</i>	X					
	<i>Moraxella</i>	<i>Moraxella osloensis</i>	X					X
Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	X	X				
Oxalobacteraceae	<i>Massilia</i>	<i>Massilia putida</i>	X					
		<i>Massilia puerhi</i>	X					
		<i>Massilia rhizosphaerae</i>	X					
Burkholderiaceae	<i>Paraburkholderia</i>	<i>Paraburkholderia fungorum</i>	X					
Phyllobacteriaceae	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium comanense</i>	X					
		<i>Mesorhizobium norvegicum</i>	X					
Propionibacteriaceae	<i>Cutibacterium</i>	<i>Cutibacterium acnes</i>	X		X			X
Acetobacteriaceae	<i>Pedomicrobium</i>	<i>Pedomicrobium americanum</i>	X					
	<i>Roseomonas</i>	<i>Neoroseomonas terrae</i>	X					
Comamonadaceae	<i>Variovorax</i>	<i>Variovorax boronicumulans</i>	X					

	<i>Xylophilus</i>	<i>Xylophilus rhododendri</i>	X					
	<i>Aquabacterium</i>	<i>Aquabacterium pictum</i>				X		
Boseaceae	<i>Bosea</i>	<i>Bosea thiooxidans</i>	X					
Reyranellaceae	<i>Reyranella</i>	<i>Reyranella terrae</i>	X					
Xanthobacteraceae	<i>Starkeya</i>	<i>Starkeya novella</i>	X					
	<i>Ancylobacter</i>	<i>Ancylobacter rudongensis</i>	X					
Xanthomonadaceae	<i>Pseudoxanthomonas</i>	<i>Pseudoxanthomonas winnipegensis</i>	X					
Mycobacteriaceae	<i>Mycolicibacterium</i>	<i>Mycolicibacterium phocaicum</i>	X					
Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium</i>	<i>Carnobacterium inhibens</i>	X					
Peptoniphilaceae	<i>Finegoldia</i>	<i>Finegoldia magna</i>	X					
Isosphaeraceae	<i>Singulisphaera</i>	<i>Singulisphaera rosea</i>	X					
Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium testaceum</i>	X					
Bacillaceae	<i>Oceanobacillus</i>	<i>Oceanobacillus massiliensis</i>	X					
	<i>Niallia</i>	<i>Niallia circulans</i>						X
Neisseriaceae	<i>Neisseria</i>	<i>Neisseria sicca</i>			X			
incertae sedis	<i>Methylibium</i>	<i>Methylibium petroleiphilum</i>	X					

<i>Rhodanobacteraceae</i>	<i>Dyella</i>	<i>Dyella ginsengisoli</i>	X					
<i>Sphaerotilaceae</i>	<i>Piscinibacter</i>	<i>Piscinibacter aquaticus</i>	X					
<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylophilus</i>	<i>Methylophilus methylotrophus</i>	X					
		<i>Methylobacterium radiotolerans</i>				X		
	<i>Methylorubrum</i>	<i>Methylorubrum extorquens</i>				X		
<i>Erwiniaceae</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea cypripedii</i>				X		
		<i>Pantoea agglomerans</i>						X
		<i>Pantoea allii</i>						X
<i>Rickettsiaceae</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Rickettsia bellii</i>				X		
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter quasiroggenkampii</i>				X		
	<i>Rosenbergiella</i>	<i>Rosenbergiella epipactidis</i>						X
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas juntendi</i>						X
<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Caulobacter</i>	<i>Caulobacter segnis</i>						X
Número total de especies por región			41	4	4	6	5	10

X = presencia

4. Discusión

En este estudio se reporta por primera vez la composición microbiana total de dos especies de flebótomos *L. aclydifera* y *L. reburra* que están presentes en las localidades boscosas de Pacto/Mashpi, Pedro Vicente Maldonado y San Miguel de los Bancos/Milpe en el Noroccidente de Pichincha. Se ha establecido la diversidad bacteriana mediante metagenómica con la secuenciación de nueva generación con amplicones completos del gen 16S, con lo que se ha evidenciado las especies más abundantes de bacterias residentes en los flebótomos.

Las condiciones y composición del entorno son cruciales para entender de qué forma se ha ido construyendo el microbioma de las *Lutzomyias*. Esta interacción es intrínseca a su desarrollo y modula la composición del microbioma ya que evidentemente no solo varía por la alimentación y sus fuentes primarias sino también por el área de desarrollo y con qué fuentes cuentan a su alrededor (Pires et al., 2017) como vegetación circundante, hojarasca, diversos biotipos o madrigueras para descanso y oviposición (Dvorak et al., 2018).

El microhábitat en el que se desarrollan los vectores varía tanto en características geográficas como climáticas. Elementos del entorno como suelo y la materia orgánica también cambia respecto a otros factores como luz solar, agua y materia orgánica de la vegetación propia del sector (Alencar et al., 2011). Que exista pocas similitudes entre la composición bacteriana se considera por sector y por especie de vector, influenciado por la diversidad al que cada *Lutzomyia* se encuentra expuesto (Telleria et al., 2018).

Lutzomyia aclydifera, se caracteriza encontrarse en Pichincha, Ibarra y Cañar (Alexander et al., 1992; Gómez, Kato, Mimori, et al., 2014), con predilección de hábitat de localidades altamente boscosas en el sector húmedo tropical, esto es confirmado por Linero et al. (2022), con el primer reporte de presencia de este flebótomo en la región del Caribe de Colombia y regiones boscosas como el bosque de Antioquia y el Valle del Cauca. Ibáñez-Bernal (2001), señalan que *L. aclydifera* no es una especie antropofílica y Hashiguchi et al. (2014) reporta como una de las más abundantes en la zona de Río verde Imbabura a 600 m, siendo esta la región más próxima a Mashpi.

En cuanto a la composición del microbioma encontrado en este estudio en *L. aclydifera* tanto en hembras como machos mostró la mayor diversidad y abundancia, caracterizando el mayor grupo de familias, géneros y especies (

Tabla 4). El recuento total mostró 42 especies propias, muchas de estas bacterias han sido relacionadas con plantas tanto patogénicas como simbiotas, bacterias del suelo, de agua y otras fijadoras de nitrógeno (Chakraborty et al., 2016; Helene et al., 2017; Liang München, 2020; Madhaiyan et al., 2009).

En perspectiva de las dos localidades, Pedro Vicente Maldonado supera en altitud a Mashpi, lo que conlleva a relacionar que la altura reduce la cantidad de bacterias del entorno donde se desarrollan las *Lutzomyias aclydifera*. Los machos también poseen un bajo recuento, con lo que se observa la altitud podría afectar, así como también la alimentación de los vectores para construir un microbioma múltiple.

Lutzomyia reburra por su parte es un flebótomo que basa su dieta en sangre de mamíferos pequeños, mantiene la transmisión enzoótica de *Leishmania* y se encuentra con mayor abundancia en localidades con alta cobertura de bosque en la región noroccidental de Pichincha como Mashpi y Milpe (Duque et al., 2020), entre los 558 m hasta 1200 m de altitud donde *L. reburra* es abundante y dominante (Arrivillaga-Henríquez et al., 2017). De acuerdo a Arrivillaga-Henríquez et al. en un reporte del 2017 menciona que naturalmente presenta infección por *Leishmania amazonensis* facilitado por la presencia de vida silvestre de la región.

L. reburra tiene una mayor presencia en la zona de San Miguel de los Bancos/Milpe con una altura de 1000 metros aproximadamente, a mayor cantidad de lutzomyias, mayor interacción con el entorno e incremento de bacterias en el microbioma, sin embargo, se puede observar que la altura influye en la diversidad, ya que hembras y machos no mostraron diversidad en las zonas más altas. Respecto a la

Tabla 4 y **Tabla 5**, esta especie mantuvo el recuento más bajo de bacterias.

La comparación entre especies de *Lutzomyia* mostró mayor diversidad y abundancia en *L. aclydifera* a diferencia de *L. reburra*. Como fue demostrado en la

Tabla 4 y la **Figura 9**, el mayor conteo se lo lleva *L. aclydifera*, sin embargo, solo cubre dos localidades de las tres evaluadas y estas pertenecen a la menor altura de la región, entre 520m y 580m (**Figura 2** y **Figura 3** **Figura 6**. Clasificación taxonómica respecto a la cantidad de lecturas con 95% de identidad encontradas en *L. aclydifera* respecto al sexo y la región.). A pesar que *L. reburra* cubre con las tres localidades del Noroccidente de Pichincha (

Figura 1), el recuento bacteriano es muchísimo menor y pertenecen a localidades altas que llegan a los 1100 metros. No existió mayor similitud entre el microbioma por cada especie de flebótomo más si las diferencias que se encuentran en cuanto a cantidad y respecto al sexo (**Figura 8**).

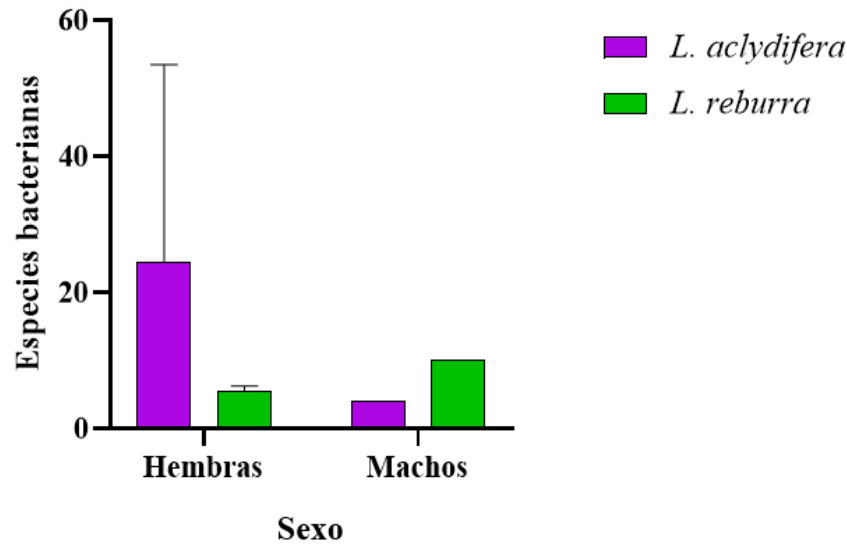


Figura 8. Total general de especies bacterianas respecto a la especie de *lutzomyia* y según el sexo

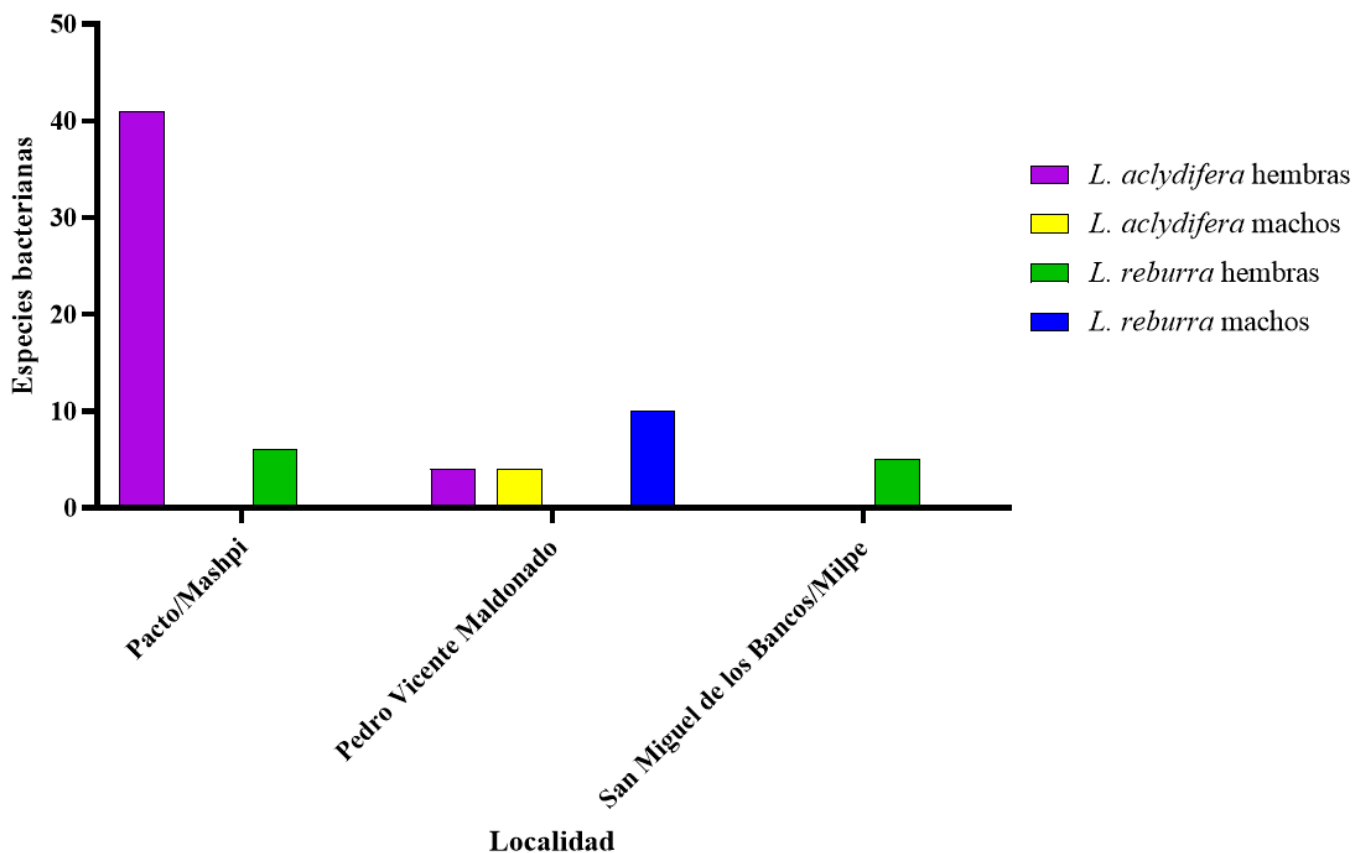


Figura 9. Diversidad bacteriana según el total de especies respecto a la localidad de muestreo de la región más baja a la región más alta.

Según la descripción bacteriana por región se afianza la idea que la diversidad se ve influenciada respecto la ubicación geográfica (Coon et al., 2016). Pedro Vicente Maldonado, Pacto y San Miguel de los Bancos presentan gradientes en altitud gracias a las estribaciones de la cordillera (GAD Pichincha & Gestión de Comunicación, 2017). Desde el punto más alto a más bajo se encuentra San Miguel de los Bancos/Milpe con la menor cantidad de especies

bacterianas detectadas (5 especies), siguiendo Pedro Vicente Maldonado con 12 especies y Pacto/Mashpi siendo la región más baja en altitud con un total de 45 especies en total (Tabla 5). Además, se puede observar que el recuento final de bacterias en Pacto/Mashpi corresponde a los vectores hembra, lo que indica que existió una influencia evidente por la región y el sexo del vector (Figura 8).

De forma particular se encontró microbioma con posible efecto simbiótico, de estas se pudo señalar las *Sphingomonas*, que fueron encontrados en las tres localidades muestreadas, tanto en *L. reburra* de ambos sexos como *L. aclydifera* hembras. De forma general, estas bacterias poseen flagelos y cilios que actúan como un sistema de anclaje con células epiteliales y con otras bacterias como *Caulobacter* (de Vries et al., 2019). A pesar de esta concordancia en el género y región, las especies bacterianas sí difieren para cada caso. Como por ejemplo *Sphingomonas echinoides* fue encontrada solo en Pacto/Mashpi y Pedro Vicente Maldonado mayormente en hembras y únicamente en *L. reburra* machos. De esta bacteria, se estima una amplia presencia en insectos ya que aporta nutricionalmente con enzimas hidrolasas que degradan oligosacáridos, manteniendo una actividad simbiótica para la disponibilidad de nutrientes (Minard et al., 2013; Zotzmann et al., 2017).

Sphingomonas leidy por su parte se encontró en Pacto/Mashpi *L. aclydifera* hembras y Pedro Vicente Maldonado *L. reburra* machos. Se conoce que esta bacteria facilita la adhesión al lumen intestinal para colonización en el tejido (Kelly et al., 2017). *Sphingomonas yabuuchiae* y *Sphingomonas hankookensis* se encontraron únicamente en San Miguel de los Bancos/Milpe de *L. reburra* hembra que de acuerdo con Hong et al. (2017), este tipo de bacterias está relacionada a beneficiar a mamíferos y vegetación circundante por la degradación de materia orgánica.

Las *Acinetobacter johnsonii* se encontró en *L. aclydifera* hembras y machos de Pacto/Mashpi y Pedro Vicente Maldonado, es una bacteria característica de dípteros hematófagos como *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* (do Nascimento et al., 2022) sin embargo no se encontró en *L. reburra*. Esta bacteria es particular ya que aporta a la digestión de la sangre ingerida y del néctar de las frutas (Baral et al., 2023; Minard et al., 2013).

Por otro lado, las *Cutibacterium acnes* se asoció en flebotomíneos machos de Pedro Vicente Maldonado y *L. aclydifera* hembras de Pacto/Mashpi, Su estructura de peptidoglicanos diferente a las demás Gram negativas favorece al anclaje con estructuras lipídicas y puede influir en las *lutzomyias* por colonización (Whale et al., 2004).

Existieron también bacterias únicas como *P. agglomerans* en *L. reburra* machos de Pedro Vicente Maldonado, del que se conoce posee un lipopolisacárido que actúa de forma inmunomoduladora y estimula el crecimiento de ciertas células epiteliales (Nakata et al., 2011), además es una de las bacterias mayormente encontradas en flebotomos transmisores de *Leishmania* (Gouveia et al., 2008), estos indicios pueden servir para determinar efectos de transmisión vectorial.

Rickettsia bellii fue encontrada únicamente en San Miguel de los Bancos en *Lutzomyia* hembras *L. reburra*. Braig et al. (2008) señala la viabilidad de esta bacteria en interactuar con células de insectos de forma endosimbiótica facultativa. Duque Granda et al. (2023) menciona que esta actividad ejerce efecto en la reproducción de las hembras favoreciendo la partenogénesis y reduciendo la cantidad de machos de la misma especie por inducción de la muerte durante la ovoposición para aumentar la supervivencia de los especímenes hembra (Cordaux et al., 2011).

También se encontró bacterias con características patogénicas como *Staphylococcus saprophyticus* que además de encontrarse en garrapatas *Rhipicephalus microplus* distribuidas en la sierra ecuatoriana (Pérez-Otáñez et al., 2024) son altamente problemáticas para la industria ganadera y se conoce que *S. saprophyticus* agrava las condiciones de bacteriemias producidas por la mordedura de *R. microplus* en bovinos (Miranda-Miranda et al., 2010). También se tiene indicios de su presencia en otros flebotomos como *Phlebotomus argentipes* y *Phlebotomus papatasi* e inducen a la ovoposición de los insectos hembras (Gunathilaka et al., 2020; Radjame et al., 1997)

Microbacterium testaceum y *Finegoldia magna* también fueron detectados en microbioma de *Rhipicephalus microplus*, sin embargo, no se ha esclarecido funciones o características particulares que favorezcan al insecto (Andreotti et al., 2011; Grigorescu et al., 2018; Mueller et al., 2008) o su influencia en otros como *lutzomyias*.

Stenotrophomonas maltophilia, por su parte sí ha sido encontrada en *L. longipalpis* en territorio brasileño (Gouveia et al., 2008). Perira de Oliveira et al. En 2001 destacan la particularidad de estas bacterias para fermentar azúcares, mientras que Gunathilaka et al. en 2020 sugieren esta como una bacteria común de Flebotomos en regiones más lejanas como Sri Lanka que a pesar de ser ubicua en suelos y reservas de agua, presenta una resistencia múltiple a antibióticos y es una de las más frecuentes en infecciones respiratorias en humanos (Brooke, 2012).

5. Conclusiones:

La secuenciación de nueva generación y el metabarcoding permitieron la identificación de un microbioma diverso en la región más baja del noroccidente de Pichincha comprendiendo Mashpi hasta Pacto. Esta región se caracterizó por contener al menos 45 especies de bacterias ubicuas en suelo, agua y otras simbioses para el vector *L. aclydifera* y *L. reburra* hembra. Mientras más alta la región menos cantidad de especies bacterianas fueron encontradas, como fue el caso de San Miguel de los Bancos/Milpe. Se corroboró la influencia de la región y el sexo del vector pues fueron más abundantes las bacterias en hembras que en machos. Se describieron también bacterias que pueden estar ligadas a favorecer infecciones bacterianas como *Staphylococcus saprophyticus* y *Stenotrophomonas maltophilia*. También bacterias con características simbióticas que influyen en la ovoposición de los vectores como *Rickettsia bellii* o *Sphingomonas echinoides* y *Acinetobacter johnsonii* que modulan la actividad metabólica alimentaria de las lutzomyias.

Es necesario recabar más información del microbioma a nivel específico de la región en las *Lutzomyias* mediante el incremento del porcentaje de identidad y de cobertura de la secuenciación, así como secuencias más largas. Mayores detalles permitirán establecer comparativas, así como por ejemplo, ampliar el rango de muestra en la región de Mashpi y separar a la región de Pacto. Adicionalmente, tomar en cuenta condiciones climáticas donde podría favorecer la proliferación del vector y modificar la conducta alimentaria como en estaciones lluviosas y secas.

Finalmente, estos datos sirven de línea base sobre la abundancia y caracterización inicial del microbioma total de en fébótomos y en las especies *Lutzomyias aclydifera* y *L. reburra* de Pichincha en Ecuador.

6. Agradecimientos:

Agradecemos al Proyecto DII-P011617_2 (JCN, JRRI) de Sandra Enríquez y Jazzmin Arrivillaga-Henríquez colaboradoras del CIZ-UCE y a su proyecto, por compartir con nosotros su arduo trabajo de muestreos, fue crucial contar con ustedes para realizar llevar este estudio a cabo. A Jazzmin Arrivillaga-Henríquez por las ideas sobre el diseño de secuenciación y revisión de este manuscrito. A Marita Celi, directora CIZ UCE por la colaboración inter institucional a favor de la información científica.

7. Referencias citadas.

- Agyekum, T. P., Botwe, P. K., Arko-Mensah, J., Issah, I., Acquah, A. A., Hogarh, J. N., Dwomoh, D., Robins, T. G., & Fobil, J. N. (2021). A systematic review of the effects of temperature on anopheles mosquito development and survival: Implications for malaria control in a future warmer climate. En *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 18, Número 14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147255>
- Alencar, R. B., de Queiroz, R. G., & Barrett, T. V. (2011). Breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and efficiency of extraction techniques for immature stages in terra-firme forest in Amazonas State, Brazil. *Acta Tropica*, 118(3), 204-208. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.10.012>
- Alexander, B., Takaoka, H., Eshita, T., Gomez, E., & Hashiguchi, Y. (1992). New records of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Ecuador. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87, 123-130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000100019>
- Andreotti, R., De León, A. A. P., Dowd, S. E., Guerrero, F. D., Bendele, K. G., & Scoles, G. A. (2011). Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-6>
- Arrivillaga-Henríquez, J., Enriquez, S., Romero, V., Echeverría Gustavo, Pérez-Barrera, J., Poveda, A., Navarro, J.-C., Warburg, A., & Benítez, W. (2017). Aspectos ecoepidemiológicos, detección natural e identificación molecular de *Leishmania* spp. en *Lutzomyia reburra*, *Lutzomyia barrettoii* y *Lutzomyia trapidoi*. *Biomedica*, 83-97. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3536>
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. En *Journal of Microbiological Methods* (Vol. 55, Número 3, pp. 541-555). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Baral, S., Chaudhary, R., & Tuladhar, R. (2023). Microbiome biodiversity associated with Midgut and Salivary gland of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2522716/v1>
- Braig, H., Alejandra Perotti, M., & Turner, B. (2008). Symbiotic *Rickettsia* (pp. 221-249). <https://doi.org/10.1201/9781420064117.ch10>

- Brooke, J. S. (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. En *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 25, Número 1, pp. 2-41). <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11>
- Bruno, F., Marinella, M., & Santamaria, M. (2015). e-DNA meta-barcoding: From NGS raw data to taxonomic profiling. *Methods in Molecular Biology*, 1269, 257-278. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2291-8_16
- Bukin, Y. S., Galachyants, Y. P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A. S., & Zemskaya, T. I. (2019). The effect of 16s rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Scientific Data*, 6. <https://doi.org/10.1038/sdata.2019.7>
- Calvopina, M., Armijos, R. X., & Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador: Current Status of Knowledge - A Review. En *Rio de Janeiro* (Vol. 99, Número 7).
- Chakraborty, S., Britton, M., Martínez-García, P. J., & Dandekar, A. M. (2016). Deep RNA-Seq profile reveals biodiversity, plant-microbe interactions and a large family of NBS-LRR resistance genes in walnut (*Juglans regia*) tissues. *AMB Express*, 6(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0182-3>
- Coon, K. L., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2016). Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Molecular Ecology*, 25(22), 5806-5826. <https://doi.org/10.1111/mec.13877>
- Coon, K. L., Vogel, K. J., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2014). Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *National Institutes of Health*, 2727-2739. <https://doi.org/10.5061/dryad.s6223>
- Cordaux, R., Bouchon, D., & Grève, P. (2011). The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. En *Trends in Genetics* (Vol. 27, Número 8, pp. 332-341). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.05.002>
- De Oliveira, E. F., Oshiro, E. T., Fernandes, W. S., Ferreira, A. M. T., De Oliveira, A. G., & Galati, E. A. B. (2017). Vector competence of *lutzomyia cruzi* naturally demonstrated for *leishmania infantum* and suspected for *leishmania amazonensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1), 178-181. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0191>
- de Vries, H. J., Beyer, F., Jarzembowska, M., Lipińska, J., van den Brink, P., Zwijnenburg, A., Timmers, P. H. A., Stams, A. J. M., & Plugge, C. M. (2019). Isolation and characterization of *Sphingomonadaceae* from fouled membranes. *npj Biofilms and Microbiomes*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-018-0074-1>
- do Nascimento, R. M., Campolina, T. B., Chaves, B. A., Delgado, J. L. F., Godoy, R. S. M., Pimenta, P. F. P., & Secundino, N. F. C. (2022). The influence of culture-dependent native microbiota in Zika virus infection in *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05160-7>
- Duque Granda, D., Ximena Moreno Herrera, C., Ester Cadavid-Restrepo, G., & José Vivero-Gómez, R. (2023). Molecular detection and phylogenetic analyses of *Arsenophonus* endosymbiont in wild specimens of phlebotomine sand flies from Colombia. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 26(1), 102023. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2022.102023>
- Duque, P. L., Arrivillaga-Henríquez, J., Enríquez, S., Ron-Garrido, L., Benítez, W., & Navarro, J. C. (2020). Spatial-temporal analysis of *lutzomyia trapidoi* and *lutzomyia reburra* (Diptera: Phlebotominae), in rural tourist locations, biosphere reserve and leishmaniasis endemic area, ecuador. *Journal of Medical Entomology*, 57(6), 1905-1912. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa102>
- Durazzi, F., Sala, C., Castellani, G., Manfreda, G., Remondini, D., & De Cesare, A. (2021). Comparison between 16S rRNA and shotgun sequencing data for the taxonomic characterization of the gut microbiota. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82726-y>
- Dvorak, V., Shaw, J., & Volf, P. (2018). Parasite biology: The vectors. En *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases* (pp. 31-77). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0_3
- Finney, C. A. M., Kamhawi, S., & Wasmuth, J. D. (2015). Does the Arthropod Microbiota Impact the Establishment of Vector-Borne Diseases in Mammalian Hosts? En *PLoS Pathogens* (Vol. 11, Número 4). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004646>
- Fraih, 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005484>
- GAD Pichincha, & Gestión de Comunicación. (2017, agosto). Pedro Vicente Maldonado. <https://www.pichincha.gob.ec/la-institucion/103-pedro-vicente-maldonado>
- 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*). En *Revista Colombiana de Entomología* (Vol. 34, Número 2).
- Gomez, E. A., Kato, H., & Hashiguchi, Y. (2014). Man-biting sand fly species and natural infection with the *Leishmania* promastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador. *Acta Tropica*, 140, 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.003>
- Gomez, E. A., Kato, H., Mimori, T., & Hashiguchi, Y. (2014). Distribution of *Lutzomyia ayacuchensis*, the vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis, at different altitudes on the Andean slope of Ecuador. *Acta Tropica*, 137, 118-122. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.05.006>
- Gomez E., & Hashiguchi Y. (1991). Monthly variation in natural infection of the sandfly *Lutzomyia ayacuchensis* with *Leishmania mexicana* in an endemic focus in the Ecuadorian Andes. *Tropical Medicine and Parasitology*, 85, 407-411. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00034983.1991.11812584>
- Gouveia, C., Asensi, M., Zahner, V., Rangel Elizabeth, & De Oliveira, S. (2008). Study on the Bacterial Midgut Microbiota Associated to Different Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neotropical Entomology*, 35, 597-601. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1519-566X2008000500016>
- Grigorescu, A. S., Renoz, F., Sabri, A., Foray, V., Hance, T., & Thonart, P. (2018). Accessing the Hidden Microbial Diversity of Aphids: an Illustration of How Culture-Dependent Methods Can Be Used to Decipher the Insect Microbiota. *Microbial Ecology*, 75(4), 1035-1048. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1092-x>
- Gunathilaka, N., Perera, H., Wijerathna, T., Rodrigo, W., & Wijegunawardana, N. D. A. D. (2020). The Diversity of Midgut Bacteria among Wild-Caught *Phlebotomus argentipes* (Psychodidae: Phlebotominae), the Vector of Leishmaniasis in Sri Lanka. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5458063>
- Harbach, R. E. (2007). The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny*. *Zootaxa*, 1668, 591-638. www.mapress.com/zootaxa/
- Hashiguchi, K., Lenin Velez, N., Kato, H., Hipatia Criollo, F., Daniel Romero, A., Eduardo Gomez, L., Luiggi Martini, R., Flavio Zambrano, C., Manuel Calvopina, H., Abraham Caceres, G., & Hashiguchi, Y. (2014). Sand fly fauna (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in different Leishmaniasis-endemic areas of Ecuador, surveyed using a newly named mini-Shannon trap. *Tropical Medicine and Health*, 42(4), 163-170. <https://doi.org/10.2149/tmh.2014-20>
- Hashiguchi, Y., Gomez L., E. A., Cáceres, A. G., Velez, L. N., Villegas, N. V., Hashiguchi, K., Mimori, T., Uezato, H., & Kato, H. (2018). Andean cutaneous leishmaniasis (Andean-CL, uta) in Peru and Ecuador: the vector *Lutzomyia* sand flies and reservoir mammals. En *Acta Tropica* (Vol. 178, pp. 264-275). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.008>
- Helene, L. C. F., Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., & Hungria, M. (2017). *Bradyrhizobium mercantei* sp. Nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6), 1827-1834. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001870>
- Hess, J. F., Kohl, T. A., Kotrová, M., Rönsch, K., Paprotka, T., Mohr, V., Hutzenlaub, T., Brüggemann, M., Zengerle, R., Niemann, S., & Paust, N. (2020). Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies. En *Biotechnology Advances* (Vol. 41). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107537>
- Hodkinson, B. P., & Grice, E. A. (2015). Next-Generation Sequencing: A Review of Technologies and Tools for Wound Microbiome Research. *Advances in Wound Care*, 4(1), 50-58. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0542>
- Hong, M., Peng, G., Keyhani, N. O., & Xia, Y. (2017). Application of the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae*, for leafroller (*Cnaphalocrocis medinalis*) control and its effect on rice phyllosphere microbial diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(17), 6793-6807. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8390-6>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801-811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- 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*, 10(6). <https://doi.org/10.1128/spectrum.03088-22>
- Ibáñez-Bernal, S. (2001). Notes on the psychodidae (Diptera) of Belize: Subfamilies Bruchomyiinae and Phlebotominae. *Annals of the Entomological Society of America*, 94(3), 367-385. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2001\)094\[0367:NOTPDO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2001)094[0367:NOTPDO]2.0.CO;2)

- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. En *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 45, Número 9, pp. 2761-2764). <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- 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>
- Liang München, J. (2020). *The Rhizobium leguminosarum Norway - Lotus burtii* interaction as a model for studying how rhizobia enter plant cells.
- Linero, J. D., Cera-Vallejo, Y., García-Alzate, R., Herrera, L., & Ardila, M. M. (2022). Phlebotomine fauna and the first record of *Lutzomyia aclydifera* (Diptera: Psychodidae) in the Colombian Caribbean. *Acta Biologica Colombiana*, 27(2), 312-315. <https://doi.org/10.15446/ABC.V27N2.91314>
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S. W., & Sa, T. M. (2009). *Methylophilus rhizosphaerae* sp. nov., a restricted facultative methylotroph isolated from rice rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(11), 2904-2908. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009811-0>
- Mancini, M. V., Damiani, C., Accoti, A., Tallarita, M., Nunzi, E., Cappelli, A., Bozic, J., Catanzani, R., Rossi, P., Valzano, M., Serrao, A., Ricci, I., Spaccapelo, R., & Favia, G. (2018). Estimating bacteria diversity in different organs of nine species of mosquito by next generation sequencing. *BMC Microbiology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1266-9>
- Minard, G., Mavingui, P., & Moro, C. V. (2013). Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. En *Parasites and Vectors* (Vol. 6, Número 1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-146>
- Miranda-Miranda, E., Cossio-Bayugar, R., Del Rosario Quezada-Delgado, M., Sachman-Ruiz, B., & Reynaud, E. (2010). *Staphylococcus saprophyticus* is a pathogen of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Biocontrol Science and Technology*, 20(10), 1055-1067. <https://doi.org/10.1080/09583157.2010.505325>
- Monteiro, C. C., Villegas, L. E. M., Campolina, T. B., Pires, A. C. M. H. A., Miranda, J. C., Pimenta, P. F. P., & Secundino, N. F. C. (2016). Bacterial diversity of the American sand fly *Lutzomyia intermedia* using high-throughput metagenomic sequencing. *Parasites and Vectors*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1767-z>
- Mueller, U. G., Dash, D., Rabeling, C., & Rodrigues, A. (2008). Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: A reevaluation. *Evolution*, 62(11), 2894-2912. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00501.x>
- NAKATA, K., INAGAWA, H., & SOMA, G.-I. (2011). Lipopolysaccharide IP-PA1 from *Pantoea agglomerans* Prevents Suppression of Macrophage Function in Stress-induced Diseases. *Anticancer Research*, 31(7), 2437. <http://ar.iiarjournals.org/content/31/7/2437.abstract>
- Oxford Nanopore Technologies. (2019). *Rapid sequencing DNA - PCR Barcoding (SQK-RPB004)*.
- Pérez-Otáñez, X., Rodríguez-Hidalgo, R., Enríquez, S., Celi-Eraza, M., Benítez, W., Saegerman, C., Vaca-Moyano, F., Ron-Garrido, L., & Vanwambeke, S. O. (2024). High-resolution prediction models for *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma cajennense* s.l. ticks affecting cattle and their spatial distribution in continental Ecuador using bioclimatic factors. *Experimental and Applied Acarology*. <https://doi.org/10.1007/s10493-023-00883-3>
- Perira de Oliveira, S. M., de Moraes, B. A., Gonçalves, C. A., Giordano-Dias, C. M., Vilela, M. L., Brazil, R. P., D'Almeida, J. M., Asensi, M. D., & Mello, R. P. (2001). [Digestive tract microbiota in female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) from colonies feeding on blood meal and sucrose plus blood meal]. *Cadernos de saude publica*, 17(1), 229-232. <http://europepmc.org/abstract/MED/11241946>
- Pires, A. C. A. M., Villegas, L. E. M., Campolina, T. B., Orfanó, A. S., Pimenta, P. F. P., & Secundino, N. F. C. (2017). Bacterial diversity of wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil) under distinct physiological conditions by metagenomics analysis. *Parasites and Vectors*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2593-7>
- Radjame, K., Srinivasan, R., & Dhanda, V. (1997). Oviposition response of phlebotomid sandfly *Phlebotomus papatasi* to soil bacteria isolated from natural breeding habitats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 35, 59-61.
- Rotureau, B. (2006). Ecology of the leishmania species in the guianan ecoregion complex.
- Tabbabi, A., Mizushima, D., Yamamoto, D. S., & Kato, H. (2022). Sand Flies and Their Microbiota. En *Parasitologia* (Vol. 2, Número 2, pp. 71-87). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/parasitologia2020008>

- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. <http://ibol.org/>
- Telleria, E. L., Martins-Da-Silva, A., Tempone, A. J., & Traub-Cseko, Y. M. (2018). Leishmania, microbiota and sand fly immunity. En *Parasitology* (Vol. 145, Número 10, pp. 1336-1353). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001014>
- Topographic-map. (2023). Mapa Topográfico san José de Mashpi, Pedro Vicente Maldonado, San Miguel de los Bancos, altitud y relieve.
- Wensel, C. R., Pluznick, J. L., Salzberg, S. L., & Sears, C. L. (2022). Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. En *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 132, Número 7). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI154944>
- Whale, G. A., Sutcliffe, I. C., Morrisson, A. R., Pretswell, E. L., & Emmison, N. (2004). Purification and characterisation of lipoglycan macroamphiphiles from *Propionibacterium acnes*.
- Yadav, K. K., Bora, A., Datta, S., Chandel, K., Gogoi, H. K., Prasad, G. B. K. S., & Veer, V. (2015). Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. *Parasites and Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1252-0>
- Zotzmann, S., Steinbrink, A., Schleich, K., Frantzmann, F., Xoumpholphakdy, C., Spaeth, M., Moro, C. V., Mavingui, P., & Klimpel, S. (2017). Bacterial diversity of cosmopolitan *Culex pipiens* and invasive *Aedes japonicus* from Germany. *Parasitology Research*, 116(7), 1899-1906. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5466-2>