

# IDENTIFICACIÓN DE TRYPANOSOMA EN MURCIÉLGOS DE SANTANDER 1

Identificación por métodos moleculares de hemoparásitos del género *Trypanosoma* en murciélagos (Orden: Chiroptera) asociados a agroecosistemas en el departamento de Santander, Colombia.

Gustavo Adolfo Castro Torres

Trabajo de Grado para Optar al Título de Biólogo

Director

Fernando Rondón González

PhD en Ciencias-Biología

Codirectora

Claudia Liliana Cuervo Patiño

PhD en Ciencias Biológicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2023

### **Dedicatoria**

Este trabajo de grado está dedicado a mi familia. Principalmente a mi padre, madre y mi hermana quienes me apoyaron desde que opté y comencé con la carrera y la pasión por la ciencia; además, por su motivación y apoyo incondicional en el transcurso de mi formación como profesional, siendo testigos de mi esfuerzo y personas fundamentales para culminar con éxito esta carrera y estar a punto de iniciar mi vida profesional.

### **Agradecimientos**

A mi padre, madre y hermana por su contante apoyo y motivación.

A Fernando Rondón por apoyar desde un principio con la temática del trabajo de grado, así como por su mentoría, tiempo, paciencia, dedicación y confianza depositada en mi durante las últimas etapas de mi carrera.

A Claudia Cuervo por su amable y grata acogida al permitirme el entrenamiento en el Laboratorio de Parasitología molecular, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, además de su valiosa guía y enseñanzas en el trascurso del presente trabajo de grado.

A todos los integrantes del laboratorio de Genética y Biotecnología por su compañerismo y colaboración en el desarrollo de mi trabajo de grado.

A Edwin, Angelica, Carolina, Gustavo y Julieth por su ayuda y colaboración en las salidas de campo.

A los profesores de la escuela de Biología por su conocimiento y docencia.

## Tabla de Contenido

	Pág.
<b>Contenido</b>	
Introducción .....	11
2. Objetivos .....	14
2.1 Objetivo General .....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. Marco teórico .....	15
3.1 Generalidades de Chiroptera.....	15
3.2 Reservorios zoonoticos y características .....	16
3.2.1 Reservorios y zoonosis .....	16
3.2.2 Potencialidad los murciélagos como reservorios zoonóticos.....	17
3.3 Familia Trypanosomatidae.....	18
3.3.1 Género Trypanosoma.....	19
3.3.2 Generalidades de las infecciones causadas por Trypanosomas .....	19
3.3.3 Mamíferos como reservorios de Trypanosma.....	21
3.4 Especies de <i>Trypanosoma</i> descritas en Chiroptera.....	22
3.5 Métodos de identificación de <i>Trypanosoma</i> .....	23
3.5.1 Identificación de Trypanosoma en quirópteros.....	24
3.5.2 Secuencias utilizadas en identificación molecular.....	25
3.6 Evidencia de infección por <i>Trypanosoma</i> en murciélagos del Neotrópico .....	26
3.6.1 Estudios en Colombia .....	28

3.6.2 Estudios en el departamento de Santander.....	29
3. Materiales y Métodos.....	30
3.1 Fase de campo.....	30
3.1.1 Área de Estudio.....	30
3.1.2 Muestreo .....	31
3.1.3 Identificación taxonómica de Chiroptera.....	32
3.1.4 Toma de la muestra.....	33
3.2 Fase de laboratorio.....	33
3.2.1 Extracción y cuantificación de ADN.....	33
3.2.2 Integridad de ADN.....	34
3.2.3 Detección por PCR de tripanosomátidos .....	34
3.2.4 Electroforesis y visualización .....	35
3.2.5 Estimación de la frecuencia de infección.....	35
3.2.6 Secuenciación .....	35
3.2.7 Análisis de secuencias.....	36
3.2.7.1 Identificación de tripanosomátidos.....	36
3.3.7.2 Análisis filogenético .....	36
4. Resultados.....	37
4.1 Muestreo y especies de Chiroptera identificadas.....	37
4.2 Muestras e integridad de ADN .....	39
4.3 Frecuencia de murciélagos infectados por parásitos tripanosomátidos .....	40
4.4 Análisis de secuencias de tripanosomátidos .....	44
5. Discusión.....	51

5.1 Chiropteros identificados.....	51
5.2 Frecuencia de murciélagos infectados por tripanosomátidos .....	54
5.3 Análisis de secuencias de tripanosomátidos. ....	57
6. Conclusiones.....	63
7. Bibliografía.....	66
Apéndices.....	91

**Lista de Tablas**

Tabla 1. *Estudios realizados en el Neotrópico*.....27

Tabla 2. *Literatura de apoyo en la identificación de especímenes recolectados en campo*. ..... 32

Tabla 3. *Relación de familias, subfamilias, especies y número de individuos de Chiroptera muestreados* ..... 38

Tabla 4. *Especies de Chiroptera infectadas con parásitos tripanosomátidos*..... 42

Tabla 5. *Especies de Chiroptera infectadas con parásitos tripanosomátidos*..... 46

Tabla 6. *Distancias genéticas promedio (p-distance) de secuencias ARNr 18S de tripanosomas secuenciados en quirópteros del departamento de Santander. Comparando 275 bp. alineamiento por Muscle (Tamura et al. 2021)*..... 50

Tabla 7. *Estudios realizados con murciélagos en Colombia*..... 52

**Lista de Figuras**

Figura 1. *Estadios morfológicos de Trypanosoma*.. ..... 21

Figura 2. *Localidades donde se realizó el muestreo del estudio*..... 31

Figura 3. *Producto amplificado del gen Citocromo b de mamíferos pequeños en muestras de quirópteros*.. ..... 40

Figura 4. *Producto amplificado del gen ARNr 18S de tripanosomátidos en muestras de quirópteros*.. ..... 41

Figura 5. *Número de individuos infectados por localidad*..... 43

Figura 6. *Relación filogenética de secuencias del gen ARNr 18S de tripanosomátidos*..... 47

Figura 7. *Reconstrucción filogenética de secuencias ARNr 18S del clado T. spp. Neobats*..... 49

**Lista de Apéndices**

	<b>pág.</b>
Apéndice A. Contenido del trabajo de grado.....	91
Apéndice B. Identidad de las secuencias obtenidas se realizó con la herramienta BLAST. ....	92

## Resumen

**Título:** Identificación por métodos moleculares de hemoparásitos del género *Trypanosoma* en murciélagos (Orden: Chiroptera) asociados a agroecosistemas en el departamento de Santander, Colombia.\*

**Autor:** Gustavo Adolfo Castro Torres\*\*

**Palabras Clave:** Chiroptera, infección, PCR anidada, tripanosomátidos

**Descripción:** Debe contener mínimo doscientas, máximo trescientas palabras.

Los murciélagos (Orden Chiroptera) destacan entre los mamíferos por ser reservorios de una gran cantidad de patógenos zoonóticos. Estos organismos mantienen los ciclos silvestres de parásitos de importancia humana y veterinaria como los incluidos en los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*. En Colombia, pese a presentar la mayor diversidad de especies de murciélagos en el Neotrópico, son pocos los estudios orientados a identificar parásitos del género *Trypanosoma* en quiropterofauna, especialmente en regiones endémicas de la enfermedad de Chagas como el departamento de Santander. Con el fin de determinar la infección con parásitos tripanosomátidos en murciélagos asociados a agroecosistemas en Santander, se realizó un muestreo en siete localidades con altitudes entre 65 y 2.353 ms. n. m. Para determinar la infección, se obtuvo ADN de muestras sanguíneas de murciélagos y se realizó PCR anidada dirigida a amplificar un fragmento del gen *ARNr 18S* de tripanosomátidos. Las secuencias obtenidas fueron usadas en análisis bioinformáticos y filogenéticos para establecer la identidad de los parásitos. Un total de 233 individuos de 26 especies de murciélagos fueron evaluados. La frecuencia de infección por parásitos tripanosomátidos se estimó en 11%. Se identificaron las especies *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma dionisii*, *Trypanosoma wauwau* y linajes del clado *Trypanosoma* spp. Neobat. Una secuencia del protozoario *Rhynchomonas nasua* fue identificada en muestras de *Carollia perpicillata*. Los resultados revelaron infección por parásitos tripanosomátidos en murciélagos presentes en diferentes agroecosistemas por debajo de 2.353 ms. n. m; asimismo, denotan una importante diversidad de tripanosomas de linajes del clado *Trypanosoma* spp. Neobat. Los quirópteros pueden tener un rol importante en los ciclos de transmisión de parásitos tripanosomátidos, soportado en 12 nuevos reportes de infección detectados en ocho especies de murciélagos neotropicales.

\* Trabajo de Grado

\*\* Universidad Industrial de Santander, Facultad de ciencias, Escuela de Biología. Director: Fernando Rondón González, PhD. Doctor en Ciencias Biología. Codirector: Claudia Liliana Cuervo Patiño PhD Ciencias Biológicas

### Abstract

**Title:** Identification by molecular methods of hemoparasites of the genus *Trypanosoma* in bats (Order: Chiroptera) associated with agroecosystems in the department of Santander, Colombia.\*

**Author(s):** Gustavo Adolfo Castro Torres \*\*

**Key Words:** Chiroptera, infection, nested PCR, trypanosomatids

### Description:

Bats (Order Chiroptera) stand out among mammals for being reservoirs of many zoonotic pathogens. These organisms maintain the wild cycles of parasites of human and veterinary importance such as those included in the genera *Trypanosoma* and *Leishmania*. Colombia, even though it has the greatest diversity of bat species in the Neotropics, there are few studies aimed at identifying parasites of the genus *Trypanosoma* in chiropter fauna, especially in endemic regions of Chagas disease such as the department of Santander. In order to determine the infection of trypanosomatids parasites in bats associated with agroecosystems in Santander, sampling was carried out in seven locations with altitudes between 65 and 2,353 ms. n. m. To determine the infection, DNA was isolated from blood samples of bats and nested PCR was performed aimed at amplifying a fragment of the 18S rRNA gene from trypanosomatids. The sequences obtained were used in bioinformatic and phylogenetic analyzes to establish the identification of the parasites. A total of 233 individuals of 26 bat species were evaluated. The frequency of infection by trypanosomatid parasites was estimated in 11%. The species *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma dionisii*, *Trypanosoma wauwau* and lineages of the clade *Trypanosoma* spp. Neobat were identified. A sequence of the protozoan *Rhynchomonas nasua* was identified in samples of *Carollia perpicillata*. The results revealed infection by trypanosomatid parasites in bats present in different agroecosystems below 2,353 ms. n. m; also, they denote an important diversity of trypanosomes from lineages of the *Trypanosoma* spp. Neobat. Bats may play an important role in the transmission cycles of trypanosomatid parasites, supported by 12 new reports of infection detected in eight neotropical bat species.

---

\* Degree Work

\*\*Universidad Industrial de Santander, Facultad de ciencias, Escuela de Biología. Director: Fernando Rondón González, PhD. Doctor en Ciencias Biología. Codirector: Claudia Liliana Cuervo Patiño PhD Ciencias Biológicas

## Introducción

Los murciélagos (orden Chiroptera) son un grupo ampliamente distribuido y el más diverso después de los roedores, correspondiendo al 20% de las especies descritas de mamíferos a nivel mundial (Díaz et al., 2016). Este grupo es un componente importante para los ecosistemas ya que ocupan una gran variedad de nichos tróficos (Luis et al., 2013), puesto que, al ser los únicos mamíferos con la capacidad de mantener un vuelo sostenido, desempeñan un papel crucial en procesos ecológicos como son: a) dispersión de semillas; b) polinización de flores y c) control de insectos considerados plagas (Hodgkinson et al., 2013).

Este grupo de mamíferos también se destaca por ser reservorio de agentes patógenos y se reconoce como portador asintomático de virus y protozoos (Brook & Dobson, 2015), principalmente. Existen reportes que los murciélagos pueden ser parasitados por agentes causantes de enfermedades de salud pública y veterinaria como Toxoplasmosis (de Jesús et al., 2017), Tripanosomiasis y Malaria (Brook & Dobson, 2015).

Trypanosomatidae es una familia de parásitos protozoarios estrechamente asociados a infección en murciélagos (Lourenço et al., 2017), con varias especies importantes en salud pública dado que causan enfermedades en humanos (Kaufer et al., 2017). Dentro de esta familia se reconoce el género *Trypanosoma*, que contiene a *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas (Nodarse et al., 2019). Esta especie de parásito suele ser transmitida por varios grupos de invertebrados, principalmente triatominos (Ramírez et al., 2014); insectos hematófagos comúnmente conocidos como “pitos” de la familia Reduviidae (Szpeiter et al., 2017). Estos insectos se distribuyen en zonas urbanas, rurales y silvestres, y transmiten el parásito tanto a animales domésticos como

salvajes (Guhl, 2009), ya sea a través del consumo de triatominos infectados o contaminación sanguínea con las heces del insecto (Hamilton et al., 2012).

Las infecciones ocasionadas por *Trypanosoma*, son consideradas zoonosis complejas que afectan a más de 70 géneros de mamíferos reservorios, dentro de los que se destacan los murciélagos (Dario et al., 2017a). Los reportes de la prevalencia de infección por hemoparásitos del género *Trypanosoma* en murciélagos del Neotrópico, son bajos para lo que se esperaría en este grupo de organismos (Ramírez et al., 2014). Ejemplo de lo anterior es la baja ocurrencia de infección (4% - 9%) en Colombia y Brasil (Dias et al., 1942; Deane, 1961; Marinkelle & Duarte, 1968), posiblemente asociado al método empleado para estimar la infección, el cual se enfocó en la descripción morfológica del parásito (Marinkelle & Duarte, 1968). De hecho, estudios realizados en los departamentos de Antioquia (Jaramillo & Moreno, 1987), Tolima y Norte de Santander (Marinkelle & Duarte, 1968) y en reportaron valores de prevalencia cercanas al 10% a partir de frotis sanguíneos. Lo anterior pone en evidencia la subestimación de la prevalencia de la infección cuando los métodos usados para determinarla no poseen una buena sensibilidad (Pinto et al., 2015).

Adicionalmente, son pocos los estudios orientados a identificar, usando marcadores moleculares, parásitos del género *Trypanosoma* en especies de murciélagos de América Latina, teniendo en cuenta el amplio rango geográfico, la diversidad de biomas y la variedad de especies presentes de murciélagos en los países de esta región, así como la modificación antrópica de los ecosistemas, la cual afecta de forma dramática la dinámica de los parásitos (Keessing et al., 2006); siendo Brasil el país donde más se han llevado a cabo (Da Costa et al., (2016).

Todos los aspectos anteriormente relacionados pueden estar presentándose en Colombia, segundo país con la mayor diversidad de especies de murciélagos a nivel mundial después de Indonesia (Humboldt Instituto, 2021); por tanto, realizar estudios en diferentes regiones del país

que incluyan métodos de identificación basados en marcadores moleculares, permitirá evaluar hipótesis sobre la ecología y distribución de las especies de *Trypanosoma* que infectan murciélagos, además de estimar la prevalencia de infección y denotar la presencia de especies de este género o de linajes no descritos para el país (Jaimes-Dueñez et al., 2020b; Ramírez et al., 2014).

El departamento de Santander está catalogado como endémico para la enfermedad de Chagas (MinSalud, 2013). Adicionalmente, de este departamento se cuenta con reportes de infección por parásitos del género *Trypanosoma* en mamíferos domésticos (Jaimes-Dueñez et al., 2020a, 2021) y silvestres diferentes a murciélagos (Reyes et al., 2017). Según el por Sociedad Colombiana de Mastozoología (Ramírez-Chaves et al., 2021), en este departamento del nororiente colombiano se han reportado cerca de 109 especies de murciélagos; de estas, algunas registradas en ecosistemas cársticos que presentan infección por *Trypanosoma* (Herrera, 2018).

Con base en el contexto anterior y dado el escaso número de investigaciones que incluyen muestras de quiropterofauna del departamento de Santander, el presente trabajo de grado, modalidad investigación, se concentró en identificar parásitos tripanosomátidos en murciélagos asociados a agroecosistemas de este departamento de Colombia. Para esto se utilizaron técnicas de biología molecular que permitieron identificar las especies de parásitos que infectan murciélagos y así establecer la frecuencia de infección y plantear hipótesis que muestran la relación filogenética de las especies y linajes de *Trypanosoma* identificados en el estudio. La información que se generó será útil al momento de dilucidar la dinámica de *Trypanosoma* en futuros estudios orientados a entender la ecología y evolución de estos parásitos en Chiroptera y otros vertebrados.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Determinar la infección por parásitos tripanosomátidos en una muestra de murciélagos presentes en agroecosistemas de distintas localidades del departamento de Santander, Colombia.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificar las especies de murciélagos colectados en diferentes agroecosistemas del departamento de Santander.
- Detectar la presencia de tripanosomátidos en las muestras de murciélagos bajo estudio.
- Estimar la frecuencia de infección por *Trypanosoma* en las muestras de murciélagos consideradas en el estudio.

### 3. Marco teórico

#### 3.1 Generalidades de Chiroptera

Los murciélagos (orden Chiroptera) incluyen más de 1400 especie descritas a nivel global (Mammal Diversity Database, 2022). Este grupo ha diversificado en un gran número de especies en un tiempo relativamente corto en comparación con otros mamíferos (Voigt & Kingston, 2016), se atribuye a que son los únicos dentro de éste grupo con un vuelo verdadero (Teeling et al., 2005). Aunque la mayoría de las especies son insectívoras, la diversidad trófica es extraordinaria para un solo orden con especies: frugívoros, nectarívoros, piscívoros, hematófagos y carnívoros (Molinari et al., 2012). Lo que conlleva a que participen en procesos ecológicos como la polinización, dispersión de semillas y el control de plagas (Hodgkison et al., 2013).

Este grupo de mamíferos se encuentran distribuidos en todos los continentes, excepto en la Antártida (Racey & Entwistle, 2003). Lo cual confiere de manera adicional un valor a este grupo de organismos porque son considerados como indicadores de biodiversidad y salud del ecosistema a nivel mundial (Voigt & Kingston, 2016). Aunado a la amplia distribución son el grupo de mamíferos, en promedio, con mayor número de especies en una localidad determinada, de hecho, la diversidad alfa puede alcanzar cerca de 70 especies en los Paleotrópicos (Kingston, 2010) y más de 100 en el Neotrópico (Rex et al., 2008).

Chiroptera es el grupo que presenta mayor riqueza de especies dentro de la clase Mammalia en el país (Ramírez-Chaves et al., 2021); corresponde al 40% de las especies de mamíferos presentes en el territorio colombiano. Se agrupan taxonómicamente en ocho familias con 217 especies descritas de las cuales ocho son endémicas, ocho se reportan en estado vulnerable y una en peligro crítico (Ramírez-Chaves et al., 2021) Estos mamíferos se distribuyen en el país entre los 0 y 3600

metros sobre el nivel de mar (ms .n .m), principalmente en zonas bajas; del total de familias reportadas, las especies pertenecientes a Phyllostomidae son las más abundantes, principalmente aquellas con hábito alimenticio frugívoro (Ramírez-Chaves et al., 2021), dentro de su dieta se incluyen frutos de plantas de las familias Moraceae, Piperaceae, Arecaceae, Anacardiaceae, Sapotaceae, Solanaceae y Meliaceae (Aroca et al., 2016); aunque algunas de estas especies de murciélagos suelen complementar su dieta con insectos (Arias & Pacheco, 2019). El segundo grupo de especies más representativas para el país corresponde a las familias Emballonuridae, Vespertilionidae y Molossidae; las cuales se caracterizan por presentar hábito alimenticio insectívoro, principalmente de los órdenes Lepidóptera, Coleoptera, Orthoptera, Homoptera, Diptera y Hemiptera (Aguilar & Antonini, 2008).

La mayoría de los estudios sobre murciélagos en Colombia se encuentran principalmente enfocados en el nivel de ecología de comunidades, inventarios o listas regionales (Rodríguez-Posada, 2010), lo que ha permitido evidenciar que pese a ser un grupo con una alta capacidad adaptativa a la perturbación del hábitat, algunas especies son altamente susceptibles a la pérdida y fragmentación, afectando el ensamblaje de las comunidades. Lo anterior conlleva tanto a la pérdida de especies como de gremios tróficos, además del reemplazo de especies especialistas por generalistas (Estrada-Villegas et al., 2010; Estrada & Coates-Estrada, 2002).

## **3.2 Reservorios zoonóticos y características**

### ***3.2.1 Reservorios y zoonosis***

Una gran variedad de organismos causantes de enfermedades o agentes patógenos como parásitos y bacterias infectan animales silvestres, contribuyendo al incremento de las enfermedades emergentes y reemergentes como una amenaza para la salud pública (Barriga, 2003). La emergencia

de enfermedades humanas ocurre cuando los patógenos de los hospedadores silvestres o domésticos pueden saltar y adaptarse en la especie humana siendo consideradas estas enfermedades como zoonosis, como en el caso de las tripanosomiosis existente en animales silvestres y humanos (Botero & Restrepo, 2012). Por lo tanto, determinar cómo los hospederos son cruciales para la persistencia de estos patógenos multihospedaderos, como es el caso de los reservorios, es esencial para el diseño de medidas de control efectivas (Viana et al., 2014).

Entre los factores que inciden en que una especie animal tenga potencial como reservorio o vector de enfermedades zoonóticas incluyen: (1) la sobreposición de su distribución geográfica respecto al área donde se encuentra la especie patógena; (2) la abundancia de especies reservorias en el ambiente; (3) las interacciones entre el parásito y el hospedero reservorio; (4) la falta de enfermedad significativa en el hospedero reservorio junto con períodos prolongados de infección que permitan la transmisión entre parásito y hospedero y (5) los hábitos tanto de las poblaciones hospederas como reservorias en ambientes naturales y antrópicos (Belt, 2018). Adicionalmente, la fragmentación de los hábitats altera la composición de las especies, muchas de ellas hospederas de patógenos, lo que incrementa el riesgo de transmisión de agentes patógenos (Patz et al., 2004).

### ***3.2.2 Potencialidad los murciélagos como reservorios de microorganismos zoonóticos***

Se han realizado muchos estudios que sugieren que los murciélagos tienen rasgos que les otorgan un potencial único para actuar como hospederos reservorio de parásitos zoonóticos (Luis et al., 2013). Precisamente, estos últimos autores determinan como rasgos para ser considerados reservorios los siguientes: 1) vida prolongada que puede permitir la persistencia de infecciones crónicas a largo plazo en la población del hospedero; 2) tamaño corporal grande; 3) letargo prolongado que ralentiza la replicación viral y reduce la actividad del sistema inmunitario; 4) vuelo y migración de larga distancia que pueden aumentar la dispersión del parásito y 5) características

de descanso que incluyen colonias muy grandes y densas que pueden albergar múltiples especies, lo que facilita la transmisión de parásitos entre especies. Dado el alto grado de diversidad de los murciélagos, se debe precisar que, cada uno de los rasgos anteriores no se encuentra en todas las especies de estos organismos.

Los rasgos anteriormente mencionados determinan que en este grupo de mamíferos alberguen una alta diversidad de parásitos, lo cual permite considerarlos como participantes importantes en procesos evolutivos y de propagación tanto de virus (Banyard et al., 2011) como de parásitos protozoarios (Hamilton et al., 2012).

### **3.3 Familia Trypanosomatidae**

La familia Trypanosomatidea está constituida por protozoos parasitarios pertenecientes al Filo Euglenozoa, orden Kinetoplastida (Baruch, 2013). Contiene 19 géneros clasificados en dos categorías que incluyen las características morfológicas así como la relación con sus hospederos (Lopes et al., 2010). Estos incluyen monoxénos (un solo hospedero), restringidos a hospederos invertebrados (principalmente insectos) como son los géneros: *Angomononas*, *Blastocrithidia*, *Bleptomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas* (Kaufer et al., 2017). Digenéticos (dos hospederos), organismos capaces de parasitar humanos, animales y plantas; que utilizan insectos como vectores, se destacan los género: *Endotrypanum*, *Phytomonas*, *Porcisia*, *Leishmania* y *Trypanosoma* (Espinosa et al., 2018 ; Lopes et al., 2010). Estos dos últimos géneros son de importancia en salud pública, ya que generan infecciones a más de 30 millones de personas en todo el mundo, a las que le pueden causar enfermedades de altas tasas de mortalidad y morbilidad, especialmente en África, América del Sur y Asia (Nodarse et al., 2019).

### **3.3.1 Género *Trypanosoma***

Las especies pertenecientes al género *Trypanosoma* presentan un flagelo y su única mitocondria contiene un kinetoplasto localizado cerca del cuerpo basal de este (Baruch, 2013). Presentan diferentes estados morfológicos, la forma tripomastigote, es la única que puede infectar a los hospederos vertebrados, presentándose en el torrente sanguíneo de éstos (Hamilton et al., 2004).

Los protozoarios de este género pueden infectar todos los grupos de vertebrados (Hamilton et al., 2007; Kaufer et al., 2017) y suelen ser transmitidos por varios grupos de invertebrados (Ramírez et al., 2014).

La clasificación del género *Trypanosoma* que infectan mamíferos se separan en dos grupos según el mecanismo de transmisión (Hoare, 1972). El grupo de los Salivaria, donde el vector inocula al hospedero el parásito mediante la picadura y, el grupo Stercoraria, donde el vector transmite al hospedero el parásito mediante contaminación con las heces infectadas que ingresan por la herida que se forma por la picadura (Hoare, 1972). Un tercer tipo de transmisión lo constituye exclusivamente *Trypanosoma equiperdum*, causante de "durina" en caballos, al cual no se le conoce el vector y su modo de transmisión es durante la cópula del hospedero (Lai et al., 2008). Los Trypanosomas salivares comprenden cuatro subgéneros: Trypanozoon, Duttonella, Nannomonas y Pycnomonas; mientras que los Stercoraria comprende tres subgéneros: Schizotrypanum, Megatrypanum y Herpetosoma (Nodarse et al., 2019).

### **3.3.2 Generalidades de las infecciones causadas por *Trypanosoma*.**

La mayoría de las especies del género *Trypanosoma* causan poco daño al hospedero. Sin embargo, en África tropical *Trypanosoma brucei* es responsables de la tripanosomiasis africana humana (enfermedad del sueño), mientras que, en el Nuevo Mundo, *T. cruzi* es considerado el

agente causal de la enfermedad de Chagas (Hamilton et al, 2009). Esta última afecta principalmente a las poblaciones humanas rurales de América del Sur y Central, y es considerada como una infección parasitaria de alta importancia para la salud pública en América Latina, por ser una patología tropical que afecta a más de 10 millones de personas, tomando decenas de vidas cada día (Rassi et al., 2012).

Los parásitos del género *Trypanosoma* tiene ciclos de vida digenéticos que se alterna entre vertebrados y vectores invertebrados hematófagos, como las moscas Tsetsé y los insectos triatomínicos (Ferri, 2022).

Estos insectos se distribuyen en América con algunos representantes en Asia, África y Australia; suelen encontrarse en zonas urbanas, rurales y silvestres; y afecta tanto animales domésticos como salvajes (Guhl, 2009). Las infecciones por *T. cruzi* presenta dos fases clínicas, una aguda y otra crónica (Muratore & Baranchuk, 2010). La fase aguda generalmente pasa desapercibida debido a la ausencia o pocos síntomas que se presentan; mientras que la fase crónica, se asocia generalmente con problemas cardíacos y gastrointestinales, y con el paso de los años la infección puede causar muerte súbita o insuficiencia por la destrucción progresiva del músculo cardíaco (Palmezano et al., 2015).

La transmisión de *T. cruzi* en mamíferos generalmente se da por contaminación sanguínea de heces de triatomínicos infectados, denominada transmisión vectorial (Hamilton et al., 2012); y consumo de triatóminos o ingestión de heces de estos insectos, transmisión oral (Baruch, 2013). Además, puede ocurrir transmisión congénita de madres que infectan a sus crías a través de la placenta (Ceballos-Pomares et al., 2018).

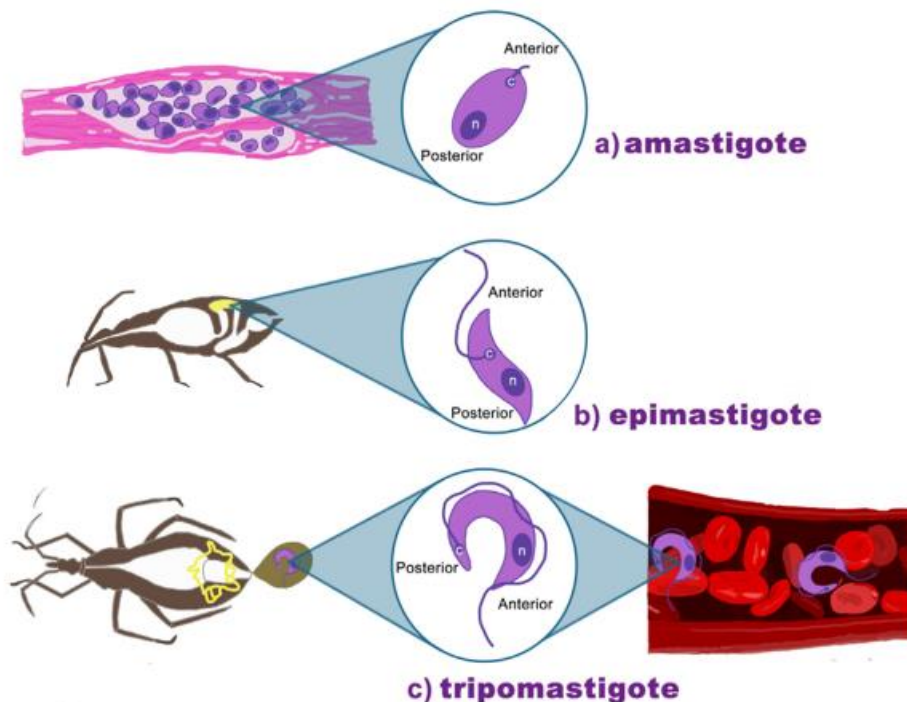
### 3.3.3 Mamíferos como reservorios de *Trypanosoma*

La infección por *T. cruzi* es una zoonosis compleja (Guhl, 2009). Además de los humanos, se han identificado en más de 70 géneros de mamíferos incluyendo una variedad de animales salvajes, entre ellos muchas especies de marsupiales, xenartros, roedores, primates, carnívoros, murciélagos, cerdos salvajes y en animales domésticos (Miles et al., 2009).

*T. cruzi* en los diversos hospederos mamíferos y en el insecto vector presenta tres formas parasitarias con diferentes características morfológicas, a saber: tripomastigote metacíclico que corresponde a la forma infectante del parásito, epimastigote forma flagelar que se encuentra dentro del vector y es la forma reproductiva del parásito en este y amastigote o forma reproductiva intracelular en los hospederos vertebrados (Botero & Restrepo, 2012) (Figura1).

#### Figura 1.

*Estadios morfológicos de Trypanosoma cruzi.*



*Nota:* n: núcleo; c: cinetoplasto. Tomado de Peña-Callejas et al., (2022)

### 3.4 Especies de *Trypanosoma* descritas en Chiroptera

Se han reportado 48 especies de parásitos del género *Trypanosoma* en más de 75 especies de murciélagos en todo el mundo (Austen & Barbosa, 2021). Los parásitos se clasifican principalmente en los subgéneros *Megatrypanum*, *Herpetosoma* y *Schizotrypanum* (da Silva *et al.* 2009; Lima *et al.* 2013). Para el subgénero *Megatrypanum* se han identificado en murciélagos las especies *T. evansi* en Brasil, Colombia, Venezuela (Filgueiras *et al.*, 2018; Ramírez *et al.*, 2014; Silva-Iturriza *et al.*, 2013); *T. theileri* en Colombia (Jaime-Dueñas *et al.*, 2020; Ramírez *et al.*, 2014). En el subgénero *Herpetosoma* las especies *Trypanosoma rangeli* en Brasil, Ecuador, Panamá, Venezuela y Colombia (Cottontail *et al.*, 2014; Ramírez *et al.*, 2014; Lourenço *et al.*, 2017; Pinto *et al.*, 2015); *T. lewisi* en Puerto Rico y Brasil (da Silva *et al.*, 2009); *T. lineatum* en Venezuela (da Silva *et al.*, 2009); *T. longiflagellum* en Irak (Marinkelle, 1977).

La mayoría de especies de *Trypanosoma* descritas en murciélagos pertenecen al subgénero *Schizotrypanum*, siendo algunas exclusivas de murciélagos (Belt, 2018) ; en este grupo se incluyen, *T. erneyi* y *T. livingstonei* en murciélagos africanos (Lima *et al.*, 2012, 2013); *T. vespertilionis* y *T. pipistrelli* en murciélagos europeos (Gardner & Molyneux, 1988); *T. vegrandi*, *T. pteropi* y *T. hipposideri* en Australia (Austen *et al.*, 2020); *T. hedricki* y *T. myotis* en América del Norte (Bower & Woo, 1981) ; *T. phyllostomae*, *T. cruzi marinkellei* y *T. desterrensis* en América Central y del Sur (Steindel *et al.* 1998; Grisard *et al.* 2002; Lima *et al.* 2012, 2013; Austen *et al.* 2015); *T. dionisii* en murciélagos de Europa y Sudamérica (Hamilton *et al.*, 2012); *T. wauwau*, *T. madeirae* y las Unidades Taxonómicas Operativas Moleculares (MOTU) *T. spp* detectadas en murciélagos neotropicales (Cottontail *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2015; Barros *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2019). Las MOTU designadas como *T. spp*. Neobats comprenden un complejo sin epíteto específico dividido en cinco linajes (Cottontail *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2019; Moreira

et al., 2021). Cada MOTU posiblemente representa una especie válida que requiere una descripción taxonómica formal (Moreia et al., 2021).

Dentro del subgénero *Schizotrypanum* destaca el clado *T. cruzi* por no ser exclusivos de los murciélagos dado que, al ser parásitos generalistas, infectan una gran variedad de hospederos mamíferos (Belt, 2018). *T. cruzi* presenta una alta heterogeneidad, la cual contiene al menos seis Unidades de Tipificación Discreta (DTU) ampliamente distribuidas en humanos, insectos vectores y reservorios, nombrados *T. cruzi* I a *T. cruzi* VI (TcI – TcVI) y un nuevo genotipo TcBAT estrictamente asociado a especies de murciélagos en Brasil, Panamá y Colombia (Marcili et al., 2009a; Ramírez et al., 2014; Zingales et al., 2012).

Distintos autores han sugerido que el clado *T. cruzi* es hermano de una especie recientemente descubierta de *Trypanosoma* de murciélago denominada *T. erneyi*, que apoya la hipótesis de “bat-seeding”, la cual hace referencia al hecho que los murciélagos constituyen un hospedero clave para la diversificación del clado *T. cruzi* (Hamilton et al., 2012; Lima et al., 2012).

### **3.5 Métodos diagnósticos de *Trypanosoma***

Distintos métodos se han implementado para identificar a parásitos del género *Trypanosoma* dada la utilidad al momento de diagnosticar tripanosomiasis en humanos (Botero & Restrepo, 2012) y dependiendo de la fase en la que esta se encuentra (López-Antuñano et al., 2000). En el caso de la etapa aguda se suelen seguir métodos directos de microscopia a partir de explorar extendidos directos de sangre al fresco, frotis o gota gruesa teñidas con Giemsa para realizar la búsqueda de formas parasitarias al microscopio (Siqueira et al., 1960). Otras variantes de la microscopia incluyen los métodos de Strout y microhematocritos. El método Strout implica centrifugar la muestra de sangre por tres ciclos para posteriormente teñir y examinar el sedimento resultante (Baruch, 2013). En el método de

microhematocritos se emplea un capilar heparinizado para tomar la muestra de sangre, luego de esto se centrifuga y se fractura el capilar con el fin de separar la capa de leucocitos del plasma y así examinar sobre un portaobjetos la capa de leucocitos, siendo útil este método en las fases finales de la etapa aguda (González-Toméa et al., 2008).

Otras alternativas empeladas para verificar la infección en esta etapa son los métodos indirectos como hemocultivo y xenodiagnóstico. En el primero de estos, se cultiva la sangre en un medio y posteriormente se examina mediante microscopia; en el segundo método se emplean insectos vectores sin infección, los cuales ingieren sangre del paciente sospechoso, si en la sangre ingerida existe el parásito se obtiene su multiplicación dentro del tubo digestivo del vector (Botero & Restrepo, 2012).

En la etapa crónica de la infección se suelen realizar pruebas serológicas que evidencian la respuesta inmune del hospedero (anticuerpos). En estos casos la detección de anticuerpos contra el parásito incluye métodos de inmunofluorescencia y prueba de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (Pinazo et al., 2010). En el método de inmunofluorescencia se emplean antígenos específicos para el parásito, al añadir una antigammaglobulina humana ligada a un fluorocromo, dicho antígeno generará un complejo con el fluorocromo y al observar al microscopio la reacción entre estos dos generará fluorescencia. Para la prueba de ELISA se utilizan antígenos de *T. cruzi* que se unirán a los anticuerpos generados por el paciente después de la infección, para esto se utiliza una placa de poliéster que adhiere proteínas a la superficie que, al ser lavadas y posteriormente agregadas a un sustrato cromógeno, se desarrolla un color visible cuando la reacción es positiva, la cual suele ser leída mediante espectrofotómetro (Baruch, 2013).

### ***3.5.1 Diagnóstico de Trypanosoma en quirópteros***

Inicialmente, la mayoría de las descripciones de *Trypanosoma* se realizaban a partir de la observación al microscopio de frotis sanguíneo en los que se buscaban caracteres morfológicos de

las especies del género (Hoare, 1972). Sin embargo, simplemente llegaban a ser descritas como "T. cruzi-like", ya que morfológicamente muchas especies de este género son indistinguibles (Hamilton et al., 2012). Además, infecciones de especies mixtas pueden llegar a ser pasadas por alto (Dario et al., 2017b).

En la actualidad, el uso de marcadores moleculares amplificados por PCR, como lo son genes presentes en el ADN mitocondrial o nuclear, han permitido entender mejor la taxonomía y ecología de estos tripanosomátidos (Da Costa et al., 2016). Esta técnica permite la identificación clara de las especies, que sumada a información generada por la geografía, contribuye a dilucidar la historia evolutiva de estos complejos patógenos (Ramírez et al., 2014).

Es así como, el uso de marcadores moleculares mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) permite la síntesis *in vitro* de millones de copias de un segmento específico del ADN, constituyendo un método altamente específico y cuya sensibilidad ayuda a determinar la existencia de varias especies de *Trypanosoma*, así como a identificar clones circulantes (Zulantay et al., 2007). El ADN nuclear y cinetoplástico (kADN) del parásito presentan regiones altamente repetidas en el genoma, estas se utilizan como blancos diagnósticos de la infección a partir del uso de cebadores específicos que flanquean regiones genómicas, por ejemplo, kADN y ARNr 18S (Ramírez et al., 2014)

### ***3.5.2 Marcadores moleculares usados para la identificación de Trypanosoma.***

Se han desarrollado una gran variedad de marcadores para distintos genes de tripanosomas, algunos de los cuales permiten la identificación a nivel de género y otros pocos para la identificación de especies (Hutchinson & Stevens, 2018). El uso de secuencias específicas del kADN, por ejemplo, han sido efectivas al momento de evidenciar alta sensibilidad en la identificación de estos parásitos

y valores de similitud cercanas al 96.5% (Wincker et al., 1994). Sin embargo, los altos niveles de polimorfismo de nucleótidos entre repeticiones de fragmentos de kADN hacen que estos genes no sean adecuados para la alineación de secuencias (Hutchinson & Stevens, 2018).

El gen ARNr 18S (ARNr 18S) es un marcador ampliamente usado para la detección molecular del género *Trypanosoma*, este gen se caracteriza por ser multicopia, altamente expresado, y presentar secuencias de nucleótidos conservadas y variables útiles para la identificación del género (Hernandez & Rivas, 1993) mediante reconstrucciones filogenéticas (Leonard et al., 2011), además las secuencias de este gen están bien representadas en bases de datos del GenBank (D'Avila-Levy et al., 2015).

Recientemente Hutchinson & Stevens (2018) han propuesto el uso de otros marcadores, como es el caso del gen Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH), por presentar una región altamente conservada. Otra secuencia utilizada es el gen mitocondrial Citocromo b (*cyt b*), el cual provee una combinación de posiciones nucleotídicas que evolucionan muy rápido y permiten estimar índices y parámetros de índole genético poblacional, además de evidenciar relaciones genealógicas (Da Costa et al., 2016).

### **3.6 Evidencia de infección por *Trypanosoma* en murciélagos del Neotrópico**

En murciélagos neotropicales las especies de Tripanosomas más comunes detectadas a partir de microscopia y molecular corresponden a *Trypanosoma cruzi*, *T. c. marinkellei*, *T. dionisii* y *T. rangeli* (García et al., 2012; Lourenço, 2016; Marcili et al., 2009a; Marinkelle, 1982; Pinto et al., 2012; Pinto et al., 2015; Ramírez et al., 2014; Villena et al., 2018). Llegado a obtener porcentajes de infección entre 4% y 80% (Tabla 1).

**Tabla 1***Estudios realizados en el Neotrópico.*

País	Metodo	Prevalencia	Especies	Referencia
Brasil	hemocultivo y molecular (SSU rRNA y gGAPDH)	4,3% - 76%	<i>T. wauwau</i> , <i>T. madeirae</i> , <i>T. rangeli</i> , <i>T. dionisii</i> , <i>T. cruzi</i> , ( <i>TcI</i> , <i>TcIV</i> ,) <i>T.c. marinkellei</i> , <i>T.sp Neobat</i>	Lourenço (2016), Da Costa et al., (2015) y Barros et al., (2019)
Panamá	microscopia y molecular (ARNr 18S)	10,2%	<i>T. rangeli</i> , <i>T. cruzi marinkellei</i> y <i>T. cruzi (TcBat)</i>	Cottontail et al., (2009); Pinto et al., (2012)
Bolivia	xenodiagnóstico, hemocultivo y molecular ( cyt b y minicircle ADN)	15%	<i>T. cruzi marinkellei</i> y <i>T. dionisii</i>	Garcia et al., (2012)
Ecuador	molecular (ARNr 18S y <i>cyt b</i> )	36,5%	<i>T. cruzi (TcBat)</i> , <i>T. cruzi marinkellei</i> y <i>T. rangeli</i>	Pinto et al., (2015)
Mexico	molecular(kDNA)	10%	<i>T. cruzi</i>	López et al., (2015)
Argentina	xenodiagnostico, hemocultivo y kDNA-PCR	12%	<i>T. cruzi (TcII)</i>	Argibay et al., (2009)
Perú	microscopia y secuencias del gen 24S $\alpha$ -ribosomal AND	34,7%	<i>T. cruzi</i> y <i>Trypanosoma sp</i>	Villena et al., (2018)
Venezuela	hemocultivos y molecular (kDNA minicircle)	80%	<i>T. cruzi</i>	Añez et al., (2009)

Otros estudios referentes han evidenciado la presencia de *T. rangeli*, *T. cruzi marinkellei* y *T. cruzi (TcBat)*, utilizando métodos de microscopia e información de un fragmento de la región genómica ARNr 18S, con una frecuencia de infección del 10% en las especies en Panamá (Cottontail et al., 2009); *T. cruzi* y *T. evansi*, utilizando microscopia de frotis, hemocultivos e información genética de genes ribosomales, mini-exon de kDNA y código de barras de longitud de fragmentos fluorescentes (FFLB), que se basa en la amplificación de regiones relativamente pequeñas de genes de ARNr 24S $\alpha$  en Venezuela (Añez et al., 2009 ; Silva-Iturriza et al., 2013); *T.*

*cruzi marinkellei* y *T. dionisii*, utilizando métodos de xenodiagnóstico, hemocultivo y la región genómica *cyt b* y minicircle ADN con una frecuencia de infección del 20% en la especie en Bolivia (García et al., 2012); *T. cruzi* y *Trypanosoma sp*, utilizando métodos de microscopia y secuencias del gen 24S  $\alpha$ -ribosomal ADN, con una frecuencia de infección del 34.7% en Perú (Villena et al., 2018); *T. cruzi* (TcBat), *T. cruzi marinkellei* y *T. rangeli* utilizando las regiones genómicas ARNr 18S y *cyt b*, con una frecuencia de infección del 36% en Ecuador (Pinto et al., 2015); *T. wauwau*, *T. madeirae*, *T. rangeli*, *T. dionisii*, *T. cruzi*, (TcI, TcIV,) *T.c. marinkellei*, T.sp Neobat, usando métodos de hemocultivo y a partir de secuencias del gen ARNr 18S, específicamente la región V7V8 en Brasil (Lima et al., 2015; Barros et al., 2019) y *T. cruzi* (TcII), con métodos empleados de xenodiagnóstico, hemocultivo y secuencias del fragmento de los minicircle kDNA de *T. cruzi* (kDNA-PCR), con una frecuencia de infección de 12% en murciélagos de Argentina (Argibay et al., 2016).

### **3.6.1 Estudios en Colombia**

En Colombia, Marinkelle & Duarte (1968) mediante métodos morfológicos como frotis y hemocultivos detectaron en murciélagos muestreados en los departamentos de Tolima y Norte de Santander la presencia de *T. cruzi* y *T. rangeli*. Con base en sus hallazgos propusieron una nueva especie denominada *T. pifanoi*. De igual manera el uso de métodos morfológicos le permitió a Jaramillo & Moreno (1987) identificar la presencia de *T. vespertilionis* en murciélagos muestreados en el departamento de Antioquia. Minter-Goedbloed et al., (1987) adicional a los análisis morfológicos incluyeron xenodiagnóstico, métodos con los que detectaron *T. cruzi* en las especies de murciélagos *Artibeus lituratus* y *Vampirum spectrum* en el departamento de Caquetá.

En cuanto a métodos moleculares distintos marcadores han sido empleados. Delgado et al., (2016) utilizaron secuencias del gen *cyt b* en murciélagos muestreados en el departamento de

Córdoba e identificaron *T. cruzi*. Otras estrategias que incluyen información de distintas regiones genómicas como *cyt b*, ARNr 18S y GAPDH, han permitido la identificación de *T. rangeli*, *T. dionisii*, *T. cruzi marinkellei* y *T. cruzi* (TcI, TcIII, TcIV, TcBat) en las especies de murciélagos *Carollia perspicillata*, *Myotis oxyotus*, *Desmodus rotundus*, *Artibeus planirostris*, *Rhynchonycteris naso* y *Artibeus fuliginosus*, muestreados en el departamento de Casanare (Ramírez et al., 2014). Recientemente, a partir de secuencias del gen ARNr 18S, específicamente la región V7V8 de este gen y sumado a código de barras de otras regiones genómicas (ITS1 ADNr y CatL-like gene), se identificó en murciélagos de las especies *Molossus molossus* y *Phyllostomus helleri*, muestreados en el departamento del Vichada, infecciones dadas por *T. theileri* y *T. wauwau* (Jaimes-Dueñez et al., 2020b). El último estudio fue reportado por Amórtegui-Hernández (2022) utilizando secuencias gen *cyt b*, identificó *T. cruzi* en las especies de murciélagos *Molossus rufus* y *Eumops nanus*, muestreados en el departamento de Casanare.

### **3.6.2 Estudios en el departamento de Santander**

Amórtegui (2018) detectó infección en 11 especies de murciélagos con una frecuencia de 30% de las muestras tomadas en Bocas del Carare, localidad del municipio de Puerto Parra; sin embargo, en el estudio no se relaciona la identificación de las especies de parásitos involucrados en la infección, pero si determina que la misma fue ocasionada por algún Kinetoplastido. Por otro lado, a partir de secuencias del gen ARNr 18S obtenidas en murciélagos de la cueva de la Macaregua (municipio de Curiti), se identificó infección por *Trypanosoma cruzi* (DTU I, II, IV y Tc Bat) y *T. cruzi marinkellei*, en las especies de murciélagos *C. perspicillata*, *Mormoops megalophylla* y *Natalus tumidirostris* (Herrera, 2018).

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1 Fase de campo

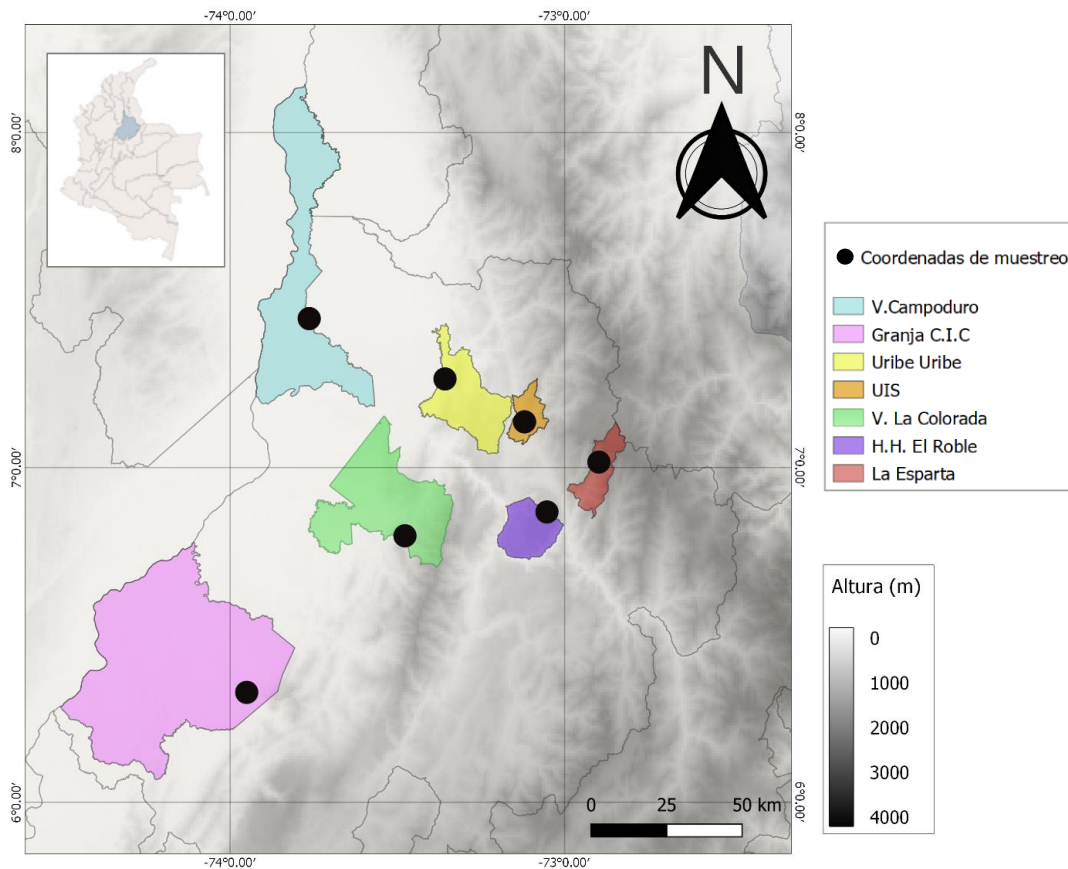
#### 4.1.1 Área de Estudio

El área de estudio comprende dos localidades colindantes al valle de río Magdalena y cuatro sobre la vertiente occidental de la Cordillera Oriental de los Andes, en el departamento de Santander, Colombia (Figura 2). Las localidades consideradas corresponden a: 1) Vereda Campo Duro, Municipio de Puerto Wilches (65 ms. n. m.); 2) Granja Colegio Integrado del Carare, Municipio de Cimitarra (156 ms. n. m.); 3) Vereda Uribe Uribe, Municipio de Lebrija (182 ms. n. m.); 4) Campus Central de la Universidad Industrial de Santander, Municipio de Bucaramanga (987 ms. n. m.); 5) Vereda La Colorada, Municipio de San Vicente de Chucurí (1.396 ms. n. m.); 6) Hotel Hacienda El Roble, Municipio de Piedecuesta (1.650 ms. n. m.) y 7) Vereda La Esparta, Municipio de Santa Bárbara ( 2.355 ms. n. m.).

Las localidades 1 a 3 y 5 a 7 se caracterizan por ser agroecosistemas debido a que el hábitat presenta perturbación con uso del suelo para cultivos, a saber: palma de aceite (*Elaeis spp*) en 1, 2 y 3, cacao (*Theobroma cacao*) en 5, café (*Coffea spp*) en 5 y 6, mora (*Rubus spp*) en 7; además, ganadería extensiva principalmente en 2 y 7. La localidad 4 se destaca por presentar vegetación típica de bosque seco en un área urbana con gran intervención humana.

**Figura 2**

*Localidades donde se realizó el muestreo del estudio.*



#### **4.1.2 Muestreo**

Para la captura de murciélagos se emplearon cuatro redes de niebla de 9 metros de longitud por localidad, y en la localidad 5 se utilizó además una red de 12 metros que permitiera tener mayor cobertura en espacios aledaños a áreas verdes y edificios. El esfuerzo de muestreo consistió en 4 noches continuas de muestreo en el que las redes permanecieron abiertas entre las 18:00h y 24:00h, rotando las redes cada dos noches. En todas las localidades excepto la séptima, las redes se ubicaron al interior de los cultivos, en zonas de transición entre bosques y cultivos y en zonas de transición entre potreros y bosques.

#### 4.1.3 Identificación taxonómica de Chiroptera

Los especímenes capturados y liberados en campo fueron identificados siguiendo las claves taxonómicas propuestas por Diaz et al., (2016) y Gardner (2007). Aquellos especímenes que fallecieron durante las faenas de captura o toma de muestra, incluidos los de difícil identificación en campo, fueron recolectados para compararlos con pieles y cráneos de referencia presentes en la colección de Mastozoología de la Universidad Industrial de Santander, además de literatura referente a taxonomía de Chiroptera (Tabla 2).

**Tabla 2**

*Literatura de apoyo en la identificación de especímenes recolectados en campo.*

<b>Género</b>	<b>Referencia</b>
<i>Anoura</i>	(Calderón-Acevedo et al., 2021)
	(Ortega & Alarcon, 2008)
<i>Artibeus</i>	(Hollis, 2005)
<i>Carollia</i>	(Ruelas,2017)
	(Zurc & Velazco, 2010)
<i>Dermanura</i>	(Calderón & Pacheco, 2012)
	(Timm, 1959)
	(Rocha et al., 2017)
<i>Myotis</i>	(Moratelli et al., 2013)
<i>Platyrrhinus</i>	(Velazco & Gardner, 2009)
<i>Saccopteryx</i>	(Davis,1976)
<i>Sturnira</i>	(Velazco & Patterson, 2019)
	(Velazco & Patterson, 2013)
<i>Glossophaga</i>	(Alvarez et al., 1991)

#### ***4.1.4 Toma de la muestra***

De cada individuo capturado se extrajo una muestra de sangre de 50µl de la vena braquial con ayuda de jeringas para insulina de un 1mL. Cada muestra tomada se depositó en tubos de microcentrífuga con 50µl de Etanol absoluto, una réplica se depositó en tarjetas de papel filtro. Cada tubo se marcó con las dos iniciales del epíteto genérico, las dos iniciales del epíteto específico y el número de captura del individuo y se almacenó a 4°C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Genética y Biotecnología de la Universidad Industrial de Santander (LGyB-UIS). Para evitar recapturas se marcó a cada individuo mediante punción en la membrana alar en forma de “C” mayúscula y posteriormente se procedió a su liberación.

Dado que este proyecto de trabajo de grado no tuvo como finalidad una recolecta masiva de especímenes, aquellos que fallecieron entre el momento de la captura o posterior a la toma de la muestra, y los de difícil identificación en campo, fueron recolectados e ingresados a la colección de Mastozoología del Museo de Historia Natural de la Universidad Industrial de Santander (MHN-UIS). De cada espécimen recolectado, se tomaron muestras de tejido cardiaco, hepático y muscular, las cuales fueron ingresadas a la colección del banco de tejidos adscrito al MHN-UIS.

## **4.2 Fase de laboratorio**

### ***4.2.1 Extracción y cuantificación de ADN***

La extracción de ADN se realizó con el protocolo de Fenol:Cloroformo adaptado de Valverde et al., (1993) por González y Martínez Jarreta (2001), con modificaciones propias de LGB-UIS que consistieron en un paso adicional de fenol, al igual que un paso adicional de cloroformo-alcohol isoamílico y en el paso de precipitación se agregó acetato de sodio 3M pH 6,8

además de un volumen extra de etanol absoluto. El ADN de cada muestra fue cuantificado en un equipo NanoDrop One (Thermo Scientific).

#### **4.2.2 Integridad de ADN**

La integridad del ADN y la presencia de inhibidores en las muestras se evaluó de acuerdo a lo recomendado por Mateus et al (2019); para esto, se amplificó por PCR un fragmento del gen Citocromo b (*cyt b*) de pequeños mamíferos a partir de los cebadores CytB Uni fw y CytB Uni rev, siguiendo las condiciones propuestas por Schlegel et al. (2012). Las muestras que exhibieron un producto amplificado de 907 pb del gen *cyt b*, fueron seleccionadas para la detección del parásito.

#### **4.2.3 Detección por PCR de tripanosomátidos**

Para determinar la infección por tripanosomátidos se amplificó un fragmento del gen ARNr 18S por medio de PCR anidada usando los cebadores y condiciones propuestos por Pinto et al. (2015). Según estos autores la primera PCR requiere el uso de los cebadores SSU4\_F y 18Sq1R, mientras que la segunda PCR utiliza los cebadores SSU561F y SSU561R; ambas reacciones de PCR requieren un perfil de temperatura touchdown. Se espera como producto de la amplificación un fragmento de 580 pb, el cual indica que la muestra es positiva para infección por tripanosomátidos, En todas las reacciones de PCR se empleó como control positivo ADN extraído a partir de una cepa de *T. cruzi* facilitada por la profesora Claudia Liliana Cuervo Patiño PhD, adscrita al Grupo de enfermedades infecciosas de Departamento de Microbiología de la Universidad Pontificia Javeriana.

#### ***4.2.4 Electroforesis y visualización***

Todos los productos amplificados el gen *cyt b*, así como los de la segunda reacción de la PCR anidada, fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Un volumen de 5µl del producto de PCR fue cargado junto con 1.5µl de EZvision (Amresco) como agente intercalante y 1 µl de glicerol. Para verificar el tamaño de los productos amplificados se utilizó marcador de peso molecular DNA Ladder 1000 bp (Thermo Scientific™). Las matrices de agarosa se sometieron a 90V durante 90 minutos, previa pre-corrída a 45V por 15 minutos. En cada electroforesis se utilizó un control positivo y el respectivo control negativo consistente en todos los reactivos de la PCR excepto ADN. Todas las matrices de agarosa fueron visualizadas en transiluminador de luz UV (Life Technologies™) a 254 nm de longitud de onda.

#### ***4.2.5 Estimación de la frecuencia de infección***

La frecuencia de infección se estimó a partir del número de muestras que exhiban producto amplificado después de la PCR anidada con respecto al número de muestras analizadas (Botero & Restrepo, 2012). Este análisis se realizó igualmente por localidad.

#### ***4.2.6 Secuenciación***

Los productos amplificados de la segunda ronda de PCR anidada se enviaron al Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular-SSiGMoL (Universidad Nacional de Colombia, Bogotá) donde se realizó la purificación (Sambrook & Russell, 2001) y secuenciación bidireccional de cada muestra en un analizador genético 3500 Series (Applied Biosystems).

#### 4.2.7 Análisis de secuencias

**4.2.7.1 Identificación de tripanosomátidos.** Para la identificación de parásitos tripanosomátidos en las muestras analizadas, las secuencias ARNr 18S obtenidas se editaron con el programa CodonCode Aligner v. 8.0.1 (CodonCode Corporation, 2018) donde se eliminaron los extremos de cada secuencia y se obtuvo un contig (una región consenso de ADN) de la secuencia forward y reverse de cada muestra. La búsqueda de identidad de las secuencias obtenidas se realizó con la herramienta BLAST, usando los parámetros predeterminados frente a la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih>).

**4.2.7.2 Análisis filogenético.** Con el objetivo de identificar el linaje al que pertenecen las secuencias obtenidas, se realizó un análisis filogenético que incluyó las secuencias propias y otras disponibles en la base de datos de GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.org](http://www.ncbi.nlm.nih.org)). Se empleó como outgroup secuencias del mismo gen de *Leishmania infantum* y *L. amazonensis*. Todas las secuencias utilizadas para este análisis fueron alineadas con MUSCLE (Edgar, 2004) implementada en el programa MEGA versión 11 (Tamura et al., 2021). Para las secuencias editadas se evaluó el mejor modelo evolutivo bajo el criterio de Akaike (AIC) con el programa Jmodel-test (Darriba et al., 2012). La reconstrucción filogenética se realizó con base en el método de máxima verosimilitud (ML) y el soporte de los nodos se evaluó a partir de 1000 aleatorizaciones de Bootstrap (Cottontail et al., 2014); estos análisis se llevaron a cabo en el programa MEGA versión 11 (Tamura et al., 2021).

Con el objetivo de brindar soporte adicional a los resultados obtenidos producto de la reconstrucción filogenética, las secuencias que quedaron agrupadas en los clados con un soporte de bootstrap menor al 85% se les realizó análisis de distancias genéticas utilizando el método p-distance implementado en el programa MEGA versión 11 (Kumar et al., 2021).

## 5. Resultados

### 5.1 Muestreo y especies de Chiroptera identificadas

El muestreo fue realizado entre octubre de 2019 hasta marzo del 2020 y se retomó en abril de 2021 en una localidad faltante a causa de la emergencia sanitaria COVID-19. En promedio el esfuerzo de muestreo consistió en 102 horas/ red/ localidad (*sensu* Villareal et al., 2004). Un total de 261 individuos pertenecientes a cinco familias y 26 especies de Chiroptera fueron muestreados. La localidad con mayor número de individuos capturados fue el campus de la Universidad Industrial de Santander en Bucaramanga (47), mientras que en la vereda la Esparta en el municipio de Santa Bárbara se presentó el menor de número de especímenes capturados (22). De la localidad Uribe Uribe en el municipio de Lebrija se obtuvo el mayor número de especies (11) y el menor se registró en el campus UIS (4) (Tabla 3).

Las especies con mayor número de individuos capturados fueron *Molossus molossus*, *C. perspicillata*, *Sturnira tildaey* *Artibeus planirostris*, y las menos frecuentes en el muestreo fueron *Mesophylla macconnelli*, *Phyllostomus hastatus*, *Myotis albescens* y *Noctilio albiventris* (Tabla 3). En general, las especies frugívoras pertenecientes a las subfamilias Carollinae y Stenodermatinae representaron el 66% del total de individuos muestreados de estas, además *C. perspicillata* y *A. planirostris* estuvieron presentes en seis localidades. El muestreo también incluyó especies insectívoras (7), nectarívoras (2), hematófagas (1), omnívoras (1) y piscívoras (1) (Tabla 3).

**Tabla 3**

*Relación de familias, subfamilias, especies y número de individuos de Chiroptera muestreados*

Familia	Subfamilia	Especie	Hábito alimenticio	Localidad							Total
				Cd	GC	UU	UIS	LC	ER	LE	
Phyllostomidae	Carollinae	<i>Carollia brevicauda</i>	F			7		5			12
		<i>Carollia perspicillata</i>	F	1	13	3		8	20	3	48
	Stenodermatinae	<i>Artibeus lituratus</i>	F I N	4	1	1	2				8
		<i>Artibeus planirostris</i>	F I N	7	5	2	6	5	3		28
		<i>Dermanura ardenseni</i>	F I			8					8
		<i>Demanura phaeotis</i>	F I							2	2
		<i>Dermanura bogotensis</i>	F						4	2	6
		<i>Sturnira erythromos</i>	F							5	5
		<i>Sturnira cf. tildae</i>	F		15	4		10	5	1	35
		<i>Sturnira spp</i>	F					5			5
		<i>Uroderma convexum</i>	F I	3	2						5
		<i>Mesophylla macconnelli</i>	F						1		1
	<i>Platyrrhinus albericoi</i>	F					1		2	3	
	<i>Platyrrhinus dorsalis</i>	F							7	7	
	Desmodontinae	<i>Desmodus rothundus</i>	H			2					2
	Glossophaginae	<i>Glossophaga soricina</i>	N F I	2		3		3	4		12
		<i>Anoura geoffroyi</i>	N F I					3	3		6
	Phyllostomidae	<i>Lophostoma brasiliense</i>	I F			3					3
		<i>Phyllostomus hastatus</i>	O			1					1
	Vespertilionidae	<i>Myotis nigricans</i>	I	2							2
<i>Myotis albescens</i>		I		1						1	
<i>Rhogeessa io</i>		I		1	1	3				5	
Molossidae	<i>Molossus molossus</i>	I	14				36			50	
Emballonuridae	<i>Saccopteryx canescens</i>	I	2							2	
Noctilionidae	<i>Noctilio albiventris</i>	I F P		1						1	
	<i>Noctilio leporinus</i>	I P		3						3	
<b>Total de especies por localidad</b>				8	9	11	4	8	7	7	26
<b>Total individuos por localidad</b>				35	42	35	47	40	40	22	261

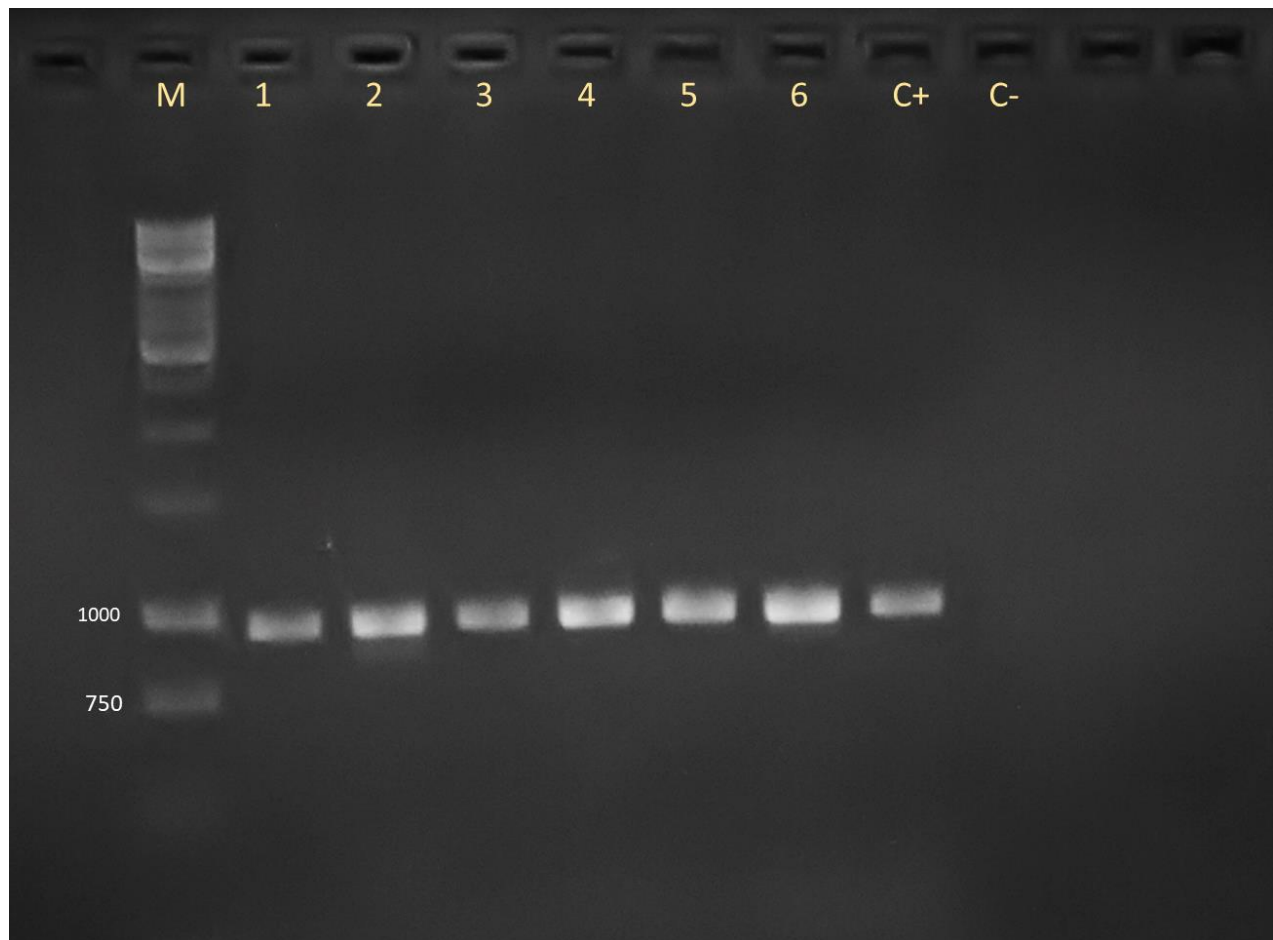
*Nota:* La clasificación de hábitos alimenticios tomado con base a lo reportado por Brito et al., 2021  
 F: Frugívoro; H: Hematófago; N: Nectarívoro; O; omnívoro I: Insectívoro; C: carnívoros; P: Piscívoro. Cd: Campoduro; GC: Granja Cica; UU: Uribe Uribe; UIS: campus UIS; LC: La Colorada; ER: El Roble; LE: La Esparta.

## 5.2 Muestras e integridad de ADN

La totalidad de muestras sanguíneas colectadas fueron positivas en la de extracción de ADN; la concentración de estas se cuantificó entre 6,4 ng/ $\mu$ l y 268 ng/ $\mu$ l (datos no mostrados). Un total de 233 muestras exhibieron producto amplificado del gen *cyt b* de pequeños mamíferos, cuando la temperatura de hibridación de la reacción de PCR fue de 52.8 °C (Anexo A). En todos los casos el producto amplificado correspondió con lo esperado (Figura 3).

### Figura 3

*Producto amplificado del gen Citocromo b de mamíferos pequeños en muestras de quirópteros.*



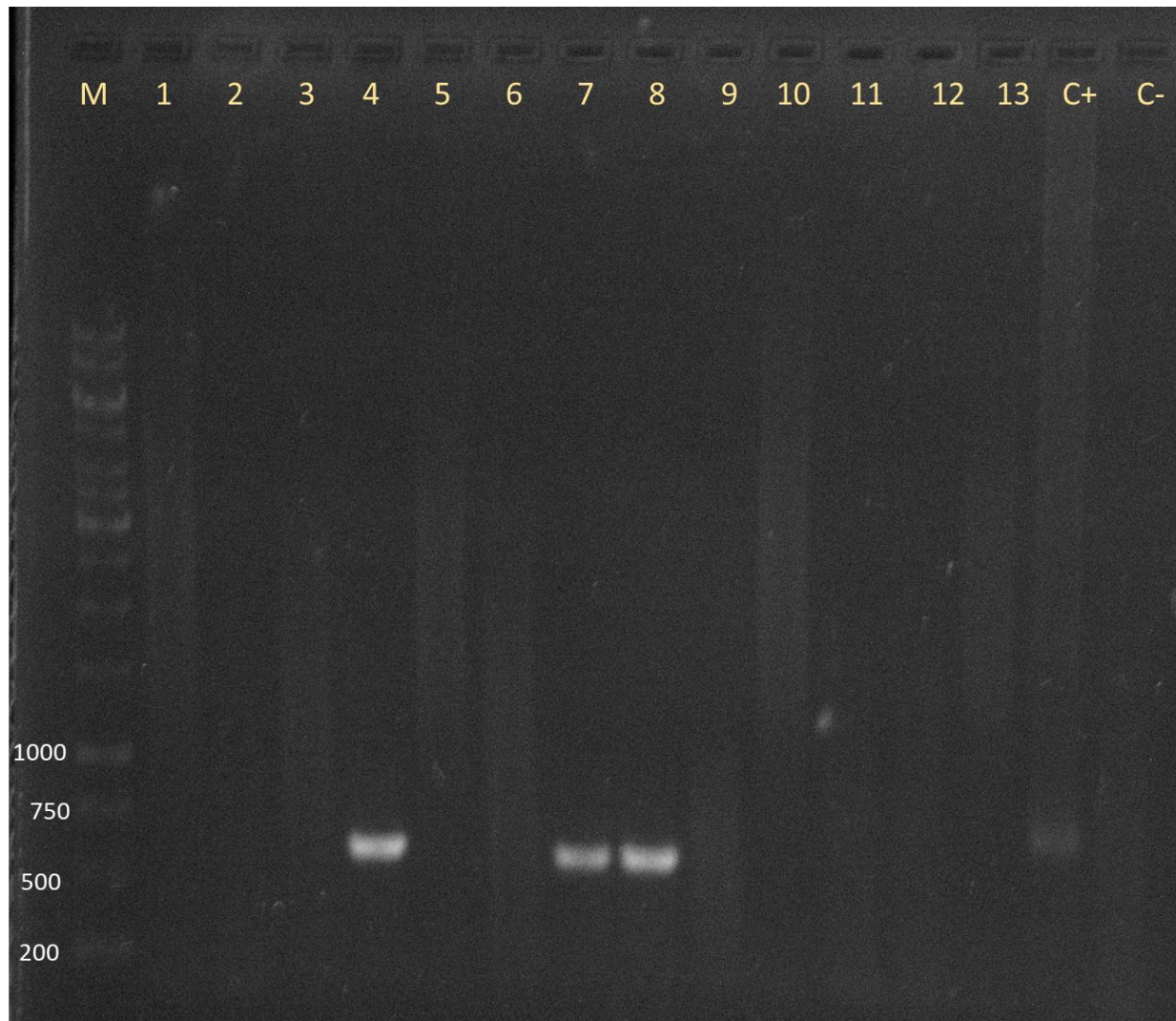
*Nota:* M: marcador de peso molecular de 1000 pb; pozos 1 a 6: amplicones de 927 pb del gen *cyt b* obtenidos en muestras de murciélagos del presente estudio; C+: control positivo; C-: control negativo.

### **5.3 Frecuencia de murciélagos infectados por parásitos tripanosomátidos**

Con la estrategia de PCR anidada dirigida a amplificar un fragmento del gen ARNr 18S (Figura 4), se detectó infección por parásitos en 26 de las 233 muestras evaluadas, de estas, 25 corresponden a parásitos tripanosomátidos (Tabla 4), lo que corresponde a un 11% de frecuencia de infección en las muestras evaluadas. El intervalo de confianza se estableció en  $0,068 < 0,11 < 0,147$ .

**Figura 4**

*Producto amplificado del gen ARNr 18S de tripanosomátidos en muestras de quirópteros.*



*Nota:* Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Se aprecia producto amplificado en los pozos 4, 7 y 8 que indican infección por tripanosomátidos; C+: Control positivo; C-: Control negativo.

**Tabla 4**

*Especies de Chiroptera infectadas con parásitos tripanosomátidos, por localidad.*

Especie	Cd	GC	UU	UIS	LC	ER	LE	Total*
<i>Carollia perspicillata</i>		1/12	1/3		2/8	1/19		5/46
<i>Artibeus lituratus</i>	2/4	1/1						3/5
<i>Artibeus planirostris</i>		1/5	1/2		2/4			4/27
<i>Sturnira cf. tildae</i>		1/15			1/9	1/5		3/33
<i>Uroderma convexum</i>	1/3							1/5
<i>Anoura geoffroyi</i>					1/3			1/5
<i>Lophostoma brasiliense</i>			3/3					3/3
<i>Platyrrhinus albericoi</i>					1/1			1/3
<i>Phyllostomus hastatus</i>			1/1					1/1
<i>Rhogeessa io</i>				1/3				1/5
<i>Molossus molossus</i>	1/14			1/27				2/41
<b>Total*</b>								25/170
<b>Total</b>	4/35	4/41	6/31	2/38	7/35	2/35	0/18	25/233

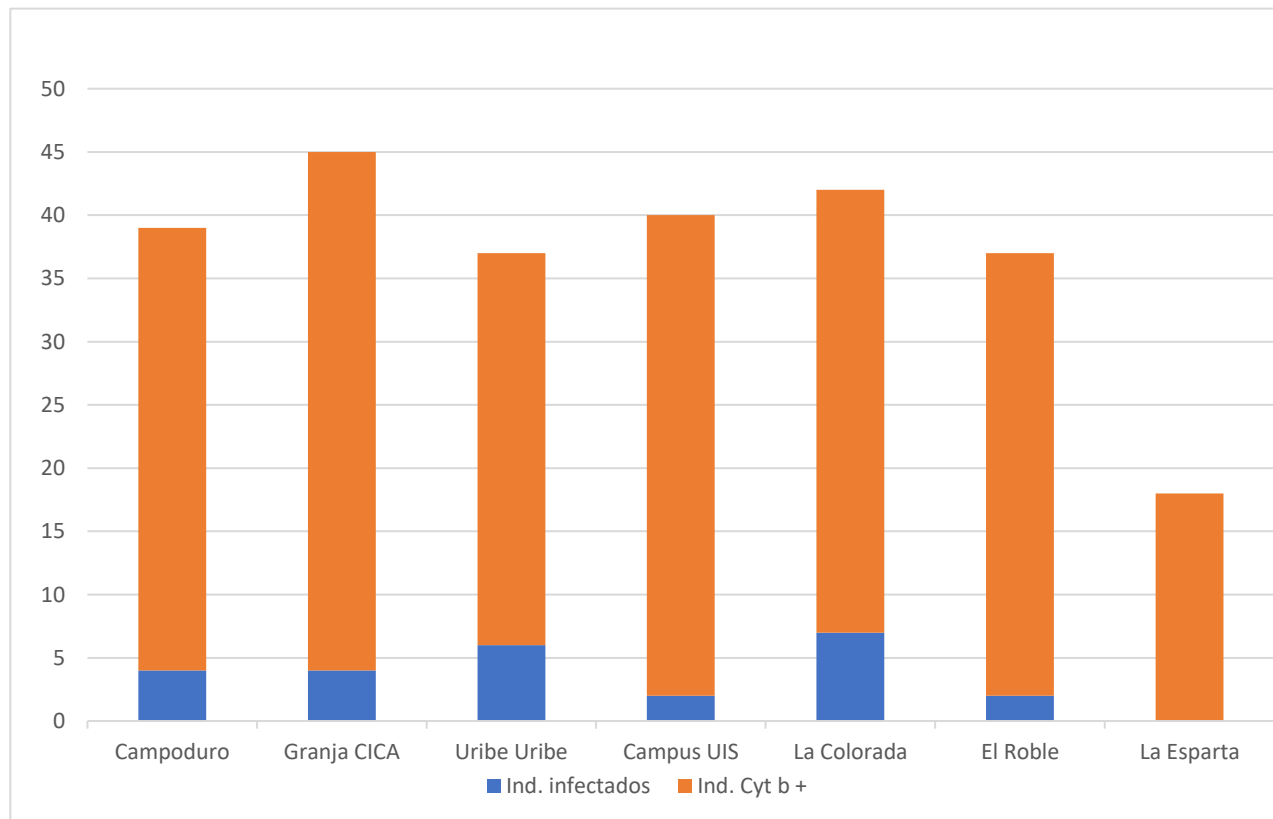
*Nota:* En todos los casos el numerador corresponde al número de muestras infectadas por parásitos tripanosomátidos respecto al total de muestras que amplificaron *cyt b* en las distintas localidades. Total\*: número de muestras infectadas por especie respecto al número total de individuos de cada especie que presentó infección. Cd: Campoduro; GC: Granja Cica; UU: Uribe Uribe; UIS: campus UIS; LC: La Colorada; ER: El Roble. LE: La Esparta.

La infección por parásitos tripanosomátidos se detectó en 25 especímenes de 11 especies de murciélagos (Tabla 4). Se destaca que el 88% de las muestras infectadas corresponden a especímenes de la familia Phyllostomidae, seguida de Molossidae (8%) y Vespertilionidae (4%). Pese al bajo número de capturas de individuos de las especies *P. hastatus* y *L. brasiliense*, se observó infección en todos los individuos muestreados. La especie de Chiroptera con mayor porcentaje de infección detectada fue *A. lituratus* (60%), mientras que en *M. molossus* se estimó el menor porcentaje de infección (4,8%) Dentro de las especies más abundante en el muestreo, *Carollia perspicillata* es la que exhibió mayor frecuencia de infección (11%) (Tabla3).

Con respecto a las localidades, La Colorada se destacó por presentar el mayor porcentaje de murciélagos infectados con parásitos tripanosomátidos (20%), seguido Uribe Uribe (19%), Campo Duro (11%), Granja CICA (10%), El Roble (6%) y Campus UIS (5%). En la localidad de La Esparta ningún individuo muestreado (Figura 5) fue detectado con la infección a partir del método utilizado.

### Figura 5

*Número de individuos infectados por localidad.*



*Nota:* En azul número de individuos infectados con parásitos tripanosomátidos por localidad (azul). En naranja número total de muestras de murciélagos que amplificaron el gen *cyt b* en las distintas localidades.

En la hipótesis de correlación entre el número de individuos evaluados respecto a los individuos infectados por localidad evaluada por prueba de Chi cuadrado de Pearson. El parámetro fue estimado con 6 grados de libertad, obteniéndose un valor  $\chi^2 = 7.488$  y  $p = 0.278$ . Este resultado denota la independencia entre el número de individuos infectados frente al número de individuos evaluados por localidad.

#### 5.4 Análisis de secuencias de tripanosomátidos

Las secuencias obtenidas del gen ARNr 18S de tripanosomátidos presentaron longitud variable, entre 400 y 669 pb. En la edición a objeto de obtener una secuencia consenso, se generaron contigs con longitud variable entre 439 y 629 pb. Producto de la comparación de secuencias obtenidas con las reportadas en el GenBank, se identificaron tres especies del género *Trypanosoma* (*T. cruzi*; *T. diosisii* y *T. wauwau*) en 8 de las 25 secuencias analizadas, cuya identidad se estimó entre en 97% y 100% (Anexo B). De igual manera, se identificó una secuencia de *Rhynchomonas nasuta* con una identidad del 97%; esta corresponde a una especie de protozoario del orden Bobonales.

En el análisis filogenético se emplearon 24 de las 26 secuencias (Tabla 5) y 42 secuencias de parásitos del género *Trypanosoma* alojadas en GenBank. En dicho análisis se excluyó la secuencia obtenida a partir de la muestra de *Platyrrhinus albericoi* de la localidad La Colorada por presentar baja calidad; además de la secuencia de *R. nasuta* la cual fue identificada en un espécimen de *C. perspicillata* muestreado en El Roble.

Una prueba de bondad de ajuste para verificar la hipótesis que existe correlación entre el sexo y los individuos infectados por parásitos Tripanosomátidos. La prueba de Chi cuadrado de Pearson

arrojo el valor  $\chi^2 = 0.96248$  (1 grado de libertad,  $p = 0.3266$ ) realizada en R Studio. Este resultado denota la independencia entre el sexo y el número de individuos infectados.

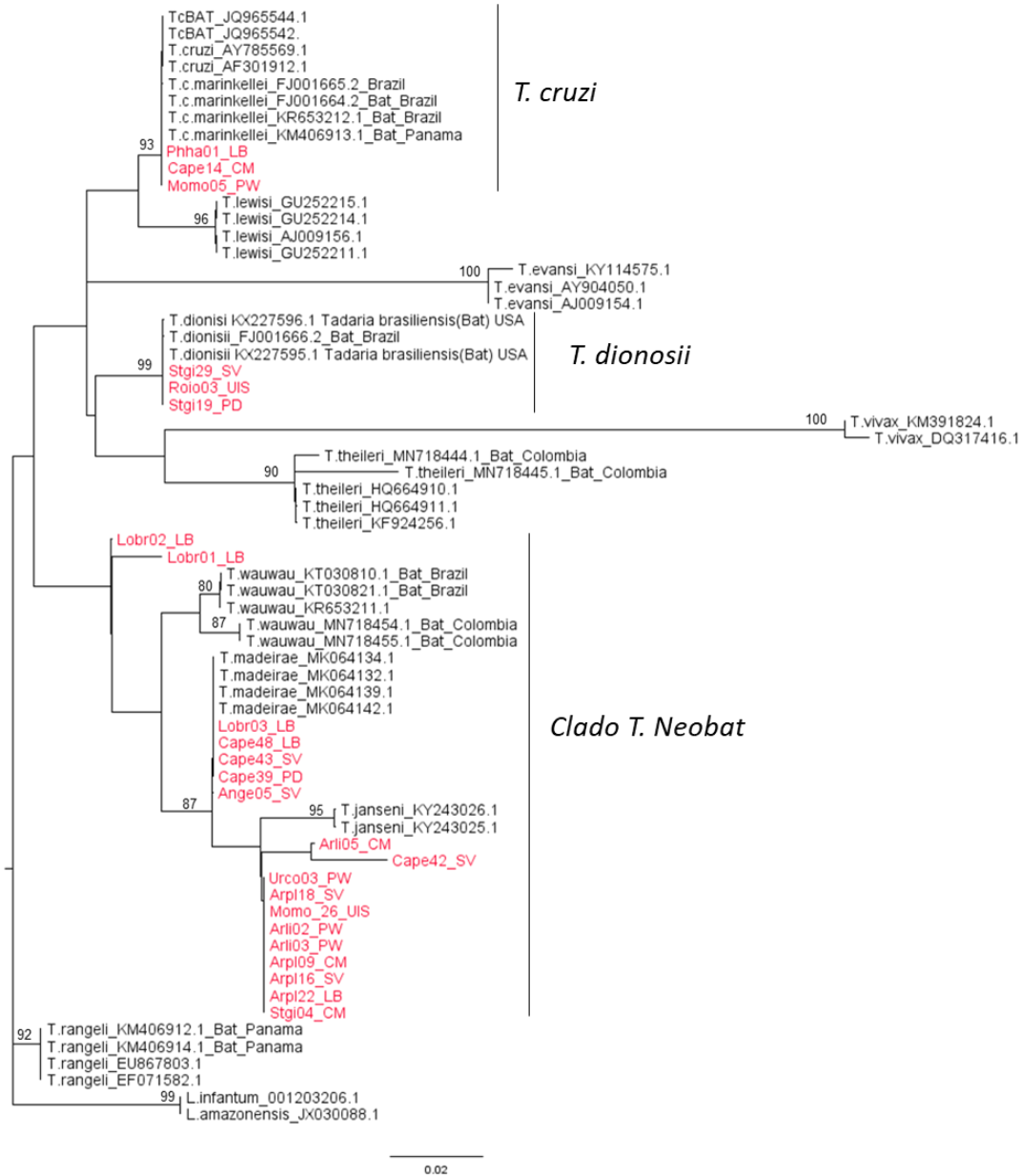
La evaluación del mejor modelo evolutivo de las secuencias empleadas en el análisis filogenético mostró que este corresponde el modelo Kimura 2-parametros (K2P) con distribución Gamma. El análisis filogenético agrupó las secuencias en tres clados (Figura 6). El primer clado incluye tres secuencias de la especie *T. cruzi* (bootstrap de 93%) identificada en las especies de Chiroptera: *P. hastatus* (Uribe Uribe), *C. perspicillata* (Granja CICA) y *M. molossus* (Campoduro). El segundo clado incluye a tres secuencias de la especie *T. dionisii*. (bootstrap de 99%), identificada en las especies: *S. cf. tildae* (La Colorada y El Roble) y *Rhogeessa io* (Campus UIS). En el tercer clado denota la inclusión de las especies pertenecientes a Tripanosomas de murciélagos neotropicales denominado *T. spp.* Neobats; en éste se encuentran incluidas las especies *T. wauwau* y *T. madeirae*. identificadas en 18 secuencias (Tabla 5).

**Tabla 5***Especies de Chiroptera infectadas con parásitos tripanosomátidos*

<b>Código</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Sexo</b>	<b>Parásito</b>	<b>Localidad</b>
Lobr03_LB	<i>Lophostoma brasiliense</i>	♀	<i>T.sp. Neobat 1</i>	Uribe Uribe
Arli05_CM	<i>Artibeus lituratus</i>	♂	<i>T.sp. Neobat 2</i>	Graja CICA
Arli02_PW	<i>Artibeus lituratus</i>	♀	<i>T.sp. Neobat 3</i>	Campo Duro
Arli03_PW	<i>Artibeus lituratus</i>	♀	<i>T.sp. Neobat 3</i>	Campo Duro
Urco03_PW	<i>Uroderma convexum</i>	♂	<i>T.sp. Neobat 3</i>	Campo Duro
Momo26_UIS	<i>Molossus molossus</i>	♂	<i>T.sp. Neobat 3</i>	Campus UIS
Arpl09_CM	<i>Artibeus planirostris</i>	♀	<i>T.sp. Neobat 3</i>	Granja CICA
Stgi04_CM	<i>Sturnira cf. tildae</i>	♂	<i>T.sp. Neobat 3</i>	Granja CICA
Arpl18_SV	<i>Artibeus planirostris</i>	♂	<i>T.sp. Neobat 3</i>	La Colorada
Arpl16_SV	<i>Artibeus planirostris</i>	♂	<i>T.sp. Neobat 3</i>	La Colorada
Arpl22_LB	<i>Artibeus planirostris</i>	♂	<i>T.sp. Neobat 3</i>	Uribe Uribe
Cape39_PD	<i>Carollia perspicillata</i>	♀	<i>T.sp. Neobat 4</i>	El Roble
Ange05_SV	<i>Anoura geoffroyi</i>	♂	<i>T.sp. Neobat 4</i>	La Colorada
Cape43_SV	<i>Carollia perspicillata</i>	♀	<i>T.sp. Neobat 4</i>	La Colorada
Cape48_LB	<i>Carollia perspicillata</i>	♂	<i>T.sp. Neobat 4</i>	Uribe Uribe
Cape42_SV	<i>Carollia perspicillata</i>	♂	<i>T.sp. Neobat 5</i>	La Colorada
Momo05_PW	<i>Molossus molossus</i>	♀	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Campo Duro
Cape14_CM	<i>Carollia perspicillata</i>	♂	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Granja CICA
Phha01_LB	<i>Phyllostomus hastatus</i>	♂	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Uribe Uribe
Roio03_UIS	<i>Rhogeessa io</i>	♀	<i>Trypanosoma diosisii</i>	Campus UIS
Stgi19_PD	<i>Sturnira cf. tildae</i>	♂	<i>Trypanosoma diosisii</i>	El Roble
Stgi29_SV	<i>Sturnira cf. tildae</i>	♂	<i>Trypanosoma diosisii</i>	La Colorada
Lobr01_LB	<i>Lophostoma brasiliense</i>	♀	<i>Trypanosoma wauwau</i>	Uribe Uribe
Lobr02_LB	<i>Lophostoma brasiliense</i>	♀	<i>Trypanosoma wauwau</i>	Uribe Uribe

**Figura 6**

*Relación filogenética de secuencias del gen ARNr 18S de tripanosomátidos.*



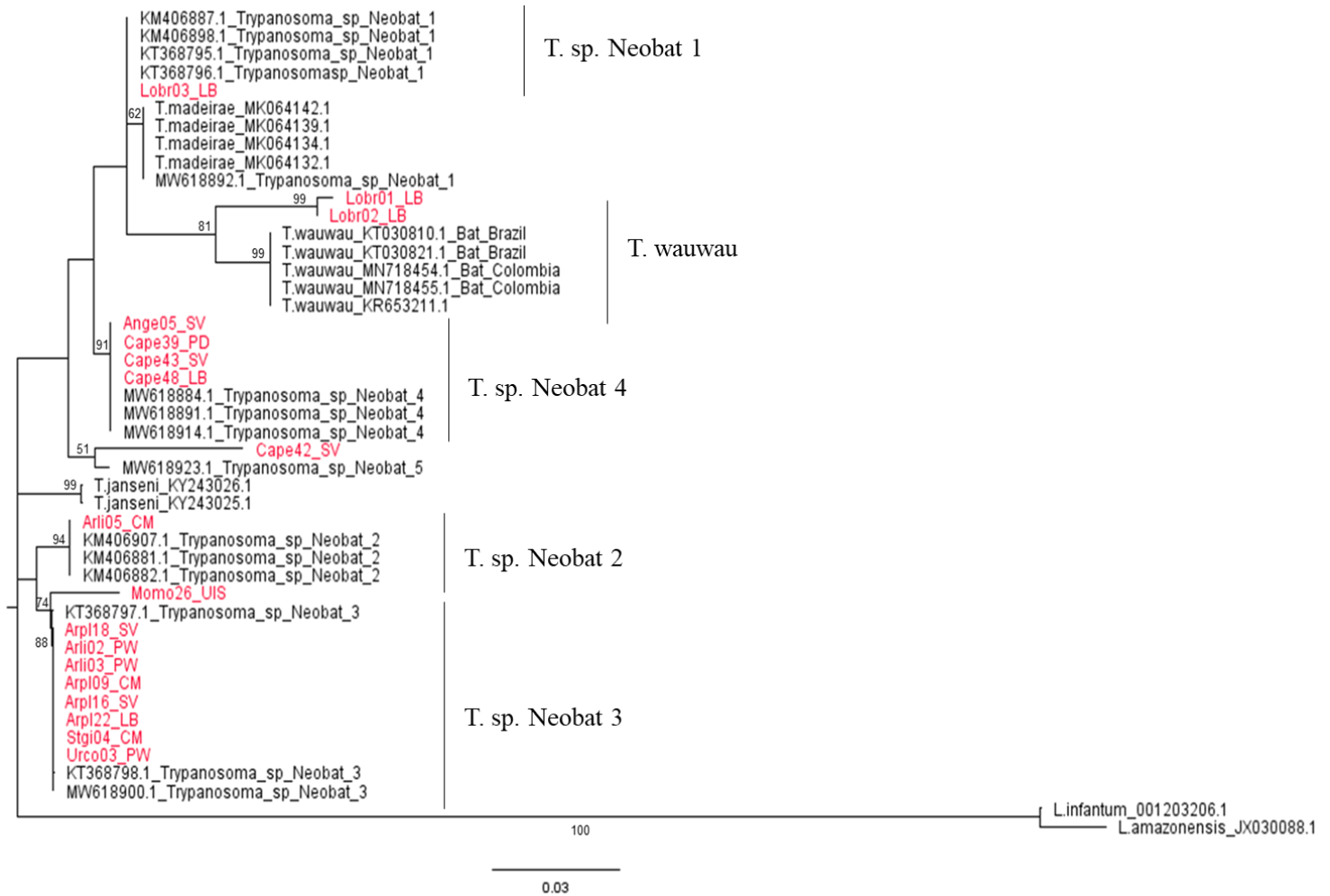
*Nota:* Comparando 221 bp, alineamiento por Muscle, del gen ARNr 18S de tripanosomátidos, construcción usando el método de Maximum Likelihood y el modelo evolutivo de las secuencias Kimura 2-parametros en Mega 11 (Tamura et al., 2021). Los taxos resaltadas en rojo corresponden a las secuencias obtenidas en el presente estudio y los porcentajes de soporte de bootstrap se encuentran descritos en los nodos correspondientes.

Con el objetivo de identificar los linajes de las secuencias agrupadas en el clado *T. spp.* Neobats se realizó un análisis filogenético con los linajes reportados para este clado (Figura 7); en este las secuencias se agruparon en seis clados. El primer clado incluye a una secuencia en el linaje *T. sp.* Neobat 1, (bootstrap de 49%), identificada en la especie *L. brasiliense* (Uribe Uribe). El segundo clado incluye dos secuencias de la especie de parásito *T. wauwau*, (bootstrap de 80%), identificada en la especie *L. brasiliense* (Uribe Uribe). El tercer clado incluye cuatro secuencias en el linaje *T. sp.* Neobat 4 (bootstrap de 91%), identificada en las especies: *A. geoffroyi* (La Colorada) y *C. perspicillata* (El Roble, La Colorada y Uribe Uribe). El cuarto clado incluye una secuencia en el linaje *T. sp.* Neobat 5 (bootstrap de 51%), identificada en la especie *C. perspicillata* (La Colorada). El quinto clado incluye una secuencia en el linaje *T. sp.* Neobat 2 (bootstrap de 94%), identificada en la especie *A. lituratus* (Graja CICA). El sexto clado corresponde a las incluidas en nueve secuencias en el linaje *T. sp.* Neobat 3 (bootstrap de 74%) identificadas en las especies: *M. molossus* (Campo UIS), *A. planirostris* (La Colorada, Granja CICA y Uribe Uribe), *A. lituratus* (Campo Duro), *S. cf. tildae* (Granja CICA) y *U. convexum* (Campo Duro) (Tabla 5).

Con el fin de brindar un soporte adicional a los clados con valores por debajo de 85%, los cuales incluyen los clados *T. wauwau*, *T. sp.* Neobat 1, *T. sp.* Neobat 3 y *T. sp.* Neobat 5, se realizó un análisis de distancias genéticas utilizando el método p-distance. Los resultados fueron congruentes con la reconstrucción filogenética donde las secuencias presentaron menor distancia genética respecto a las secuencias de referencia del clado en el que se agruparon (Figura 7). Sin embargo, la secuencia Lobr01\_LB presentó la misma distancia genética con *T. wauwau* y *T. sp.* Neobat 1 mientras que la secuencia detectada en la muestra Cape42\_SV presentó mayor distancia genética respecto a las secuencias del clado donde se agrupa (Tabla 6).

**Figura 7**

*Reconstrucción filogenética de secuencias ARNr 18S del clado T. spp. Neobats.*



*Nota:* Comparando 275 bp, alineamiento por Muscle, de el gen ARNr 18S de tripanosomátidos, construcción usando el método de Maximum Likelihood y el modelo Kimura 2-parametros en Mega 11 (Tamura et al., 2021). Los taxos resaltadas en rojo corresponden a las secuencias obtenidas en el presente estudio. Los valores de los nodos corresponden a los porcentajes soporte de bootstrap.

**Tabla 6**

*Distancias genéticas promedio (p-distance) de secuencias ARNr 18S de tripanosomas secuenciados en quirópteros del departamento de Santander. Comparando 275 bp. alineamiento por Muscle (Tamura et al. 2021).*

	Arpl18_SV	Momo26_UIS	Arli02_PW	Arli03_PW	Arpl09_CM	Arpl16_SV	Arpl22_LB	Cape42_SV	Lobr01_LB	Lobr02_LB	Lobr03_LB	Stgi04_CM	Urco03_PW
Arpl18_SV													
Momo_26_UIS	<b>0.018</b>												
Arli02_PW	<b>0.000</b>	<b>0.017</b>											
Arli03_PW	<b>0.000</b>	<b>0.017</b>	<b>0.000</b>										
Arpl09_CM	<b>0.000</b>	<b>0.017</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>									
Arpl16_SV	<b>0.000</b>	<b>0.017</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>								
Arpl22_LB	<b>0.000</b>	<b>0.017</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>							
Cape42_SV	0.056	0.059	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056						
Lobr01_LB	0.060	0.074	0.060	0.060	0.060	0.060	0.060	0.077					
Lobr02_LB	0.060	0.074	0.060	0.060	0.060	0.060	0.060	0.074	<b>0.007</b>				
Lobr03_LB	<b>0.028</b>	0.042	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	0.056	<b>0.039</b>	<b>0.039</b>			
Stgi04_CM	<b>0.000</b>	0.017	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.056	0.060	0.060	<b>0.028</b>		
Urco03_PW	<b>0.000</b>	0.017	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.056	0.060	0.060	<b>0.028</b>	<b>0.000</b>	
<i>T.janseni</i> KY2	<b>0.021</b>	<b>0.035</b>	<b>0.021</b>	<b>0.021</b>	<b>0.021</b>	<b>0.021</b>	<b>0.021</b>	0.060	0.060	0.060	<b>0.025</b>	<b>0.021</b>	<b>0.021</b>
<i>T.madeiraae</i> MK06	<b>0.032</b>	<b>0.046</b>	<b>0.032</b>	<b>0.032</b>	<b>0.032</b>	<b>0.032</b>	<b>0.032</b>	0.060	<b>0.042</b>	<b>0.042</b>	<b>0.004</b>	<b>0.032</b>	<b>0.032</b>
<i>T.wauwau</i> KT03	<b>0.043</b>	0.053	<b>0.042</b>	<b>0.042</b>	<b>0.042</b>	<b>0.042</b>	<b>0.042</b>	0.067	<b>0.039</b>	<b>0.035</b>	<b>0.035</b>	<b>0.042</b>	<b>0.042</b>
<i>T.wauwau</i> KT03	<b>0.043</b>	0.053	<b>0.042</b>	<b>0.042</b>	<b>0.042</b>	<b>0.042</b>	<b>0.042</b>	0.067	<b>0.039</b>	<b>0.035</b>	<b>0.035</b>	<b>0.042</b>	<b>0.042</b>
T.sp Neobat_1	<b>0.028</b>	<b>0.042</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	0.056	<b>0.039</b>	<b>0.039</b>	<b>0.000</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>
T.sp Neobat_1	<b>0.028</b>	<b>0.042</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	0.056	<b>0.039</b>	<b>0.039</b>	<b>0.000</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>
T.sp Neobat_2	<b>0.014</b>	<b>0.021</b>	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>	<b>0.049</b>	<b>0.067</b>	0.067	<b>0.035</b>	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>
T.sp Neobat_2	<b>0.014</b>	<b>0.021</b>	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>	<b>0.049</b>	<b>0.067</b>	0.067	<b>0.035</b>	<b>0.014</b>	<b>0.014</b>
T.sp Neobat_3	<b>0.000</b>	<b>0.017</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.056	<b>0.060</b>	0.060	<b>0.028</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
T.sp Neobat_3	<b>0.000</b>	<b>0.017</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.056	<b>0.060</b>	0.060	<b>0.028</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
T.sp Neobat_4	<b>0.025</b>	<b>0.039</b>	<b>0.025</b>	<b>0.025</b>	<b>0.025</b>	<b>0.025</b>	<b>0.025</b>	0.053	<b>0.049</b>	<b>0.049</b>	<b>0.011</b>	<b>0.025</b>	<b>0.025</b>
T.sp Neobat_4	<b>0.025</b>	<b>0.039</b>	<b>0.025</b>	<b>0.025</b>	<b>0.025</b>	<b>0.025</b>	<b>0.025</b>	0.053	<b>0.049</b>	<b>0.049</b>	<b>0.011</b>	<b>0.025</b>	<b>0.025</b>
T.sp Neobat_5	<b>0.028</b>	<b>0.042</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	<b>0.042</b>	<b>0.049</b>	0.053	<b>0.025</b>	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>

*Nota:* en la fila superior se lista las secuencias obtenidas en este estudio.

## **6. Discusión**

Este estudio constituye el primer reporte de quirópteros infectados por parásitos tripanosomátidos, detectados mediante técnicas moleculares en murciélagos asociados a agroecosistemas en el departamento de Santander, ubicados en un gradiente altitudinal comprendido entre 65 ms. n. m y 2.353 ms. n. m. Los resultados brindan información de nuevos reportes de las especies hospederas y parásitos a nivel del departamento y neotrópico.

### **6.1 Chiropteros identificados**

En comparación con otros reportes enfocados en identificación y frecuencias de infección por parásitos tripanosomátidos el presente estudio es significativamente mayor en cuanto al número total de individuos capturados y especies evaluadas (Tabla 7).

**Tabla 7**

*Estudios realizados con murciélagos en Colombia.*

<b>N° Individuos</b>	<b>N° Especies</b>	<b>Departamento</b>	<b>Enfoque</b>	<b>Referencia</b>
233	26	Santander	Determinación molecular con métodos moleculares de infección de tripanosomátidos	Presente trabajo
175	6	Casanare	Identificación molecular de <i>Trypanosoma</i>	(Ramírez et al 2014)
30	4	Córdoba	Deteccion con métodos moleculares de <i>T. cruzi</i>	(Delgado et al .,2016)
115	4	Santander	Identificar molecular de parásitos tripanosomátidos	(Herrera, 2019)
39	3	Vichada	Estimar frecuencia de infección por <i>Trypanosoma</i>	(Jaimes-Dueñez et al., 2020b)
172	9	Casanare	Estimar frecuencia de infección por <i>Trypanosoma</i> y <i>Leishmania</i>	(Zúñiga, 2021)
235	NR	Casanare y Cundinamarca	Detección con métodos moleculares la la presencia de tripanosomátidos en ecorregiones.	(Amórtegui-Hernández et al., 2022)

Estas diferencias en los tamaños de los muestreos en los distintos estudios podría estar relacionada con la abundancia de los individuos en determinadas zonas o problemas logísticos (Jovani & Tella, 2006). El bajo número de muestro conlleva a un aumento del umbral de incertidumbre al estimar de la frecuencia de infección por un parásito en una población (Hajian-Tilaki, 2011); además, teniendo en cuenta la alta diversidad de especies estimadas para Colombia, una bajo muestreo puede repercutir en la ausencia de representatividad de especies potencialmente hospederas pertenecientes en un ecosistema o una sobre o subestimación de la frecuencia de infección por parásitos en una población.

En la identificación de las especies se utilizó las características cráneo-dentales (Rodríguez-Posada, 2010) de un individuo por morfoespecies; producto de la identificación de dichos ejemplares, todos se encuentran reportados en la plataforma GBIF para el departamento de

Santander ([https://www.gbif.org/es/occurrence/search?occurrence\\_status=present](https://www.gbif.org/es/occurrence/search?occurrence_status=present)) y de estas se destaca los escasos reportes de las *M. macconnelli*, *M. albescens*.

De las especies identificadas el 66% presentan hábitos frugívoros (66%), seguidas de insectívoros (24%) y nectarívoros (20%) (Tabla 3), patrón concordante con otros estudios realizados en el neotrópico (Estrada-Villegas et al., 2010; Echavarría-R et al., 2018). Puesto que las especies frugívoras pertenecientes a las subfamilias Carrollinae y Sternodermatinae, presentan una alta capacidad de resiliencia y son favorecidas por la constante oferta alimenticia proporcionada por plantas en los ecosistemas neotropicales (Aroca et al., 2016; Echavarría-R et al., 2018).

Otro factor que está involucrado en este resultado es el uso de redes de niebla de sotobosque efectivas para la captura de especies frugívoras, como las pertenecientes a la Phyllostomidae. Sin embargo, es un sesgo para la captura de murciélagos insectívoros, los cuales pueden evadir estas redes o utilizan estratos superiores del bosque (Kalko, 1998). Excepto en el caso de la especie *M. molossus*, siendo la especie insectívora más abundante en el muestreo (Tabla 3). Ramírez-Chaves et al., (2008) atribuye la abundancia de *M. molossus* a razón de su resiliencia en ambientes antrópicos, mayor presencia de insectos y el empleo de edificios como reposaderos para sus colonias.

Lo anterior constituye un soporte adicional de que el muestreo de murciélagos realizado en el presente estudio coincide con reportes previos de inventarios realizados en la cordillera de los Andes (Bejarano-Bonilla et al., 2007; Morales-Martínez & Díaz, 2020). Además, el muestreo en comparación a estudios con el mismo enfoque realizados en el país evidencia un esfuerzo diferencial identificado en el número de individuos y el número de especies muestreadas, lo cual podrá verse reflejado en la infección de parásitos como en la frecuencia de la misma.

## 6.2 Frecuencia de murciélagos infectados por tripanosomátidos

En el presente trabajo se estableció que el 11% en el total de las muestras analizadas (233) presentaron infección de parásitos tripanosomátidos. Este resultado difiere del reportado por Herrera (2019), cuya frecuencia de infección fue de 66%, en murciélagos en la Macaregua en el departamento de Santander. Dicha diferencia puede deberse principalmente al bajo número de individuos muestreados, todos referentes a una misma localidad (cueva Macaregua). Respecto a otro estudio realizado en la Orinoquia, la frecuencia de infección aquí reportada estaría dentro del rango comprendido entre 0.85% y 66% (Amórtegui-Hernández, 2022; Jaime-Dueñez et al., 2020b; Ramírez et al., 2014). Las diferencias en los resultados pueden ser consecuencia del tamaño del muestreo y la abundancia de reservorios (Jaimes-Dueñez et al., 2020b; Stevens et al., 2001; Zúñiga, 2021), entre otros aspectos.

Es de destacar que los estudios mencionados también implementan métodos de detección moleculares, los cuales incrementan la sensibilidad de detección de parásitos cuando se comparan con métodos de microscopía (Austen & Barbosa, 2021; Pinto, 2021; Silva et al., 2019). Pese a lo anterior la sensibilidad de la PCR puede verse influenciada por el método de extracción de ADN, el volumen de sangre requerido (Schijman et al. 2011. Ferrer et al., 2013) y la presencia de parásitos en fase crónica de la infección en sangre (Duarte et al., 2014). Sin embargo, las técnicas moleculares han permitido entender más la diversidad y las relaciones filogenéticas del género *Trypanosoma*, dado que anteriormente muchos de los parásitos aislados de murciélagos fueron caracterizados por morfología, lo que generó un vacío en lo que se conoce de la información genética de estos organismos (Austen & Barbosa, 2021).

En murciélagos neotropicales se ha llegado a obtener porcentajes de infección entre 10% y 80% (Cottontail et al., 2009; García et al., 2012; Marcili et al., 2009a; Marcili et al., 2009b; Pinto

et al., 2012; Ramírez et al., 2014); por tanto, el presente estudio se establece en dicho rango y coincide con valores de infección de estudios realizados en Panamá, Brasil y México (10% y 12%) (Acosta et al., 2014; López-Cancino et al., 2015; Pinto et al., 2012).

Varios de estos investigadores, respecto a los factores que influyen en la infección en las poblaciones de murciélagos, los autores argumentan que los cambios en los ecosistemas, debido al uso antropogénico de la tierra, influyen en la modificación de las dinámicas de los patógenos y vectores, debido a la alteración en las poblaciones de los hospederos disponibles. Ejemplo de lo anterior lo constituye lo reportado por López-Cancino et al., (2015), quienes plantearon que la infección en los murciélagos fue mayor en áreas selváticas en contraste con ecotonos y hábitats domésticos, aspecto atribuido a la disponibilidad de hospederos que puedan interactuar con los vectores en cada uno de estos ecosistemas.

A pesar de que el número de individuos capturados no fue significativo ( $\chi^2 = 7.488$  y  $p = 0.278$ ) al comparar la frecuencia de infección por localidad, en Uribe Uribe, Granja CICA y Campoduro, presentaron altos porcentajes de infección en el presente estudio (Figura 5). En estas localidades predomina el cultivo de palma de aceite (*Elaeis spp*), las cuales suelen ser habitados por Triatominos (Soto et al., 2014); insectos considerados como vectores principales de parásitos del género *Trypanosoma* (Hernández et al., 2020). Esta característica presente en las localidades anteriormente mencionadas pueden favorecer la infección de los murciélagos que habitan o explotan dicho ecosistemas (Ramírez et al., 2014).

La localidad La Colorada, presentó el mayor porcentaje de infección (20%), esta se caracteriza por extensas fragmentaciones de bosque para el cultivo de café, aguacate y cacao. Dicha característica puede influir en la infección, tal como Cottontail et al., (2014) lo evidenciaron en

áreas con bosques fragmentados, donde la infección en murciélagos es mayor en la detectada en regiones de bosques continuo.

Berrizbeitia et al., (2012) reportaron que los hábitats urbanizados pueden alterar la presencia de los vectores involucrados, siendo más frecuente las infecciones en zonas peri-urbanas y rurales. Lo anterior permitiría explicar el bajo porcentaje de infección (5%) detectado en La UIS, al ser una localidad urbana.

El hecho de no detectarse infección en los individuos muestreados en La Esparta, se podría relacionar con el límite del rango de distribución de los vectores triatominos, siendo este 2000 m. n. m (Càceres et al., 2005). Sin embargo, es de resaltar que otros insectos hematófagos, cimicidos (chinches) y sifonápteros (pulgas), también pueden estar involucrados como vectores en la infección de parásitos tripanosomátidos (Austen & Barbosa, 2021). No obstante, el bajo número de capturas que se obtuvo en esta localidad pudo haber influenciado el resultado generando un sesgo en la estimación de la infección.

Teniendo en cuenta lo anterior el porcentaje de infección obtenido en el presente estudio, en comparación con los estudios realizado en el país, podría estar influenciado por el tamaño de la muestra, la sensibilidad de la técnica de detección empelada y el área de estudio evaluada (Jaime-Dueñez et al., 2020b). Puesto que todas las localidades son consideradas agroecosistemas, debido al alto grado de fragmentación para actividades de agricultura o pecuarias (Hart, 1985). Sin embargo, para corroborar lo anterior sería necesario evaluar la dinámica de infección teniendo en cuenta gradientes de fragmentación dentro áreas evaluadas; puesto que cada hábitat presenta diferentes características que podrían estar asociadas con el proceso de infección (Jansen et al., 2018).

### 6.3 Análisis de secuencias de tripanosomátidos

El análisis realizado con Blast de las 24 secuencias obtenidas mostró identidad con tres especies de parásitos del género *Trypanosoma*, a saber: *T. cruzi*, *T. dionisii* y *T. wauwau*, soportados por el análisis filogenético y de distancias, con los cuales se aportó además la identidad del clado *T. spp.* Neobats.

El hallazgo de secuencias de *T. cruzi* (Figura 6) en muestras de las especies *P. hastatus* y *M. molossus*, constituyen el primer reporte de infección por este parásito en quiróptero fauna muestreada en el departamento de Santander. Adicionalmente, este parásito se encontró infectando muestras de individuos de *C. perspicillata*; hallazgo que coincide con lo reportado por Herrera (2018) para el departamento de Santander. Por su parte, Amórtegui-Hernández (2022) había reportado infección por *T. cruzi* en *P. hastatus* y Ramírez et al., (2014) en *C. perspicillata*, a partir de individuos muestreados en el departamento de Casanare; mientras que Delgado et al., (2016) reportó este parásito infectando individuos de *C. perspicillata* y *M. molossus* en el departamento de Córdoba. La infección por *T. cruzi* en estas especies de murciélagos posiblemente se deba a las preferencias alimenticias y el tipo de hábitat que ocupan (Ramírez et al., 2014). En este orden de ideas *P. hastatus* y *M. molossus* suelen ser insectívoras, mientras que *C. perspicillata*, complementa su dieta con insectos (Arias & Pacheco, 2019).

Los murciélagos neotropicales juegan un papel relevante como reservorios de *T. cruzi*, parásito que afecta la salud de sus hospederos, como lo demuestran muchos estudios en todo el continente (Cottontail et al., 2009; Guhl & Ramírez, 2011; Ramírez et al., 2014; Lourenço et al., 2018; Pinto et al., 2015; Torres-Castro et al., 2021). Esta especie de parásito se encuentra subdividida en DTUs, de éstos algunos están más relacionados con infecciones silvestres y otros con domésticos; pese que este estudio no tuvo como objetivo establecer el tipo de DTUs presente

en los murciélagos infectados, el material recolectado podría servir para futuros estudios de esta índole.

La especie de parásito *T. dionisii* (Figura 6) se detectó en las especies de murciélagos *S. cf. tildae* y *R. io*, hallazgo que constituye el primer reporte de infección por dicho parásito en estas especies de murciélagos en el neotrópico. Ramírez et al., (2014) reportaron dicho parásito en individuos de *C. perspicillata*, *M. oxyotus*, *A. planirostris* y *A. fuliginosus*. A nivel de neotropico se han reportado infecciones de *T. dionisii* en murciélagos de los generos: *Sturnira*, *Carollia*, *Artibeus*, *Glossophaga* y *Desmodus*, en Brasil y Bolivia (Cavazzana et al., 2010; García et al., 2012; Lourenço, 2016).

La infección por *T. dionisii* en *S. cf. tildae* posiblemente puede ser explicada por la ingestión de insectos cimicidos por los murciélagos (Lourenço et al., 2018) o por ectoparasitismo de estos insectos hacia los murciélagos (Ondřej et al., 2012). En el caso de *R. io* la muestra infectada correspondió a un neonato. Sin embargo, la madre de este individuo no se encontró infectada quizás por el hecho que este parásito se puede albergar en el tejido cardiaco y esquelético, impidiendo la amplificación positiva en la muestra sanguínea (Austen & Barbosa, 2021). La infección en el neonato podría ser explicada como consecuencia de transmisión congénita; sin embargo, este tipo de transmisión en murciélagos solo se ha comprobado con *T. cruzi* (Añez et al., 2009), lo cual sería recomendable indagar con otras pruebas para verificar que la transmisión congénita también puede ocurrir con *T. dionisii*.

Esta especie de parásito está catalogado como no patógeno y estricto de murciélagos, pese a lo descrito se cuenta con un reporte de infección por *T. dionisii* en humanos (Dario et al., 2016). Para el caso de los murciélagos, puede llegar a tener un potencial patógeno dado que ha sido

encontrado en tejido esquelético en estado amastigote en la especie *Pistrellus pipistrellus* (Oliveira et al., 2009).

En los resultados de la reconstrucción filogenética del clado *T. spp.* Neobats (Figura 7), la especie de parásito *T. wauwau* se detectó en dos individuos de la especie de murciélago *L. brasiliensis*, constituyendo este el primer reporte de dicha infección en el neotrópico. Jaimes-Dueñez et al., (2020b) reportaron esta especie de parásito en Colombia en *M. molossus* y *P. heller*. Otros reportes han sido realizados en quirópteros de Australia y Brasil, siendo detectados en los géneros de murciélagos *Pteronotus* (Lima et al., 2015) y *Anoura* (de Oliveira et al., 2018) respectivamente. El mecanismo de transmisión de este parásito no está del todo esclarecido pero se ha sugerido que puede ser mediante picadura de ectoparásitos (Rodrigues et al., 2019); adicional a lo anterior también puede ocurrir la infección oral mediante ingestión de ectoparásitos, y probablemente dado que los murciélagos viven en colonias y comparten actividades de acicalamiento y alimentación, puede contribuir esto la transmisión del parásito (Jaime-Dueñez et al., 2020b).

Barros et al., (2019) reportaron el linaje *T. sp.* Neobat 3 en la especie *A. lituratus* en Boyaca. Otros linajes de *T. sp.* Neobat han sido detectado en murciélagos filostómidos de Panamá y Brasil, donde *T. sp.* Neobat 1 muestra el rango más amplio es capaz de infectar cinco especies de distintos géneros (*A. jamaicensis*, *T. cirrosis*, *S. tildae*, *D. rotundus* y *C. perspicillata*), *T. sp.* Neobat 2 se observó únicamente en *Artibeus* (*A. jamaicensis*, *A. lituratus* y *A. planirostris*), *T. sp.* Neobat 3 en *Artibeus* (*A. jamaicensis*, *A. lituratus* y *A. cinereus*), *T. sp.* Neobat 4 es un parásito bien establecido en *Carollia* y *T. sp.* Neobat 5 es el linaje más recientemente descrito en *A. cinereus* (Barros et al., 2019; Moreia et al., 2021).

En el presente estudio se amplían los rangos de las especies hospederas y se reporta infección de los linajes, *T. sp.* Neobat 1 en *L. brasiliensis*; *T. sp.* Neobat 3 en *U. convexum*, *M. molossus*, *A. planirostris* y *S. tildae*; *T. sp.* Neobat 4 en *A. geoffroyi* y *T. sp.* Neobat 5 en *C. perspicillata*. Cabe destacar que una de las secuencias *T. sp.* Neobat 1 se agrupó en el clado de *T. madeirae* (Figura 7); este hallazgo puede explicarse ya que *T. madeirae* anteriormente estuvo clasificado como *T. sp.* Neobat 1 (Barros et al., 2019) y en consecuencia, la muestra Lobr\_03 reportada en el presente, requeriría análisis más profundos que permitan discernir de mejor manera la clasificación de la misma. La secuencia Momo26\_UIS que agrupó en el clado *T. sp.* Neobat 3, al igual que la secuencia Cape42\_SV que agrupó en el clado *T. sp.* Neobat 5, presentaron longitudes de ramas prolongadas; esto indica que dichas secuencias presentan gran variación respecto a las secuencias de referencia. De igual manera, pese que a estas secuencias agrupan en los referidos clados, no se debe asegurar que se pueden clasificar dentro de los linajes *T. sp.* Neobat 3 y *T. sp.* Neobat 5, respectivamente; hecho que puede guardar relación con el bajo soporte presentado en los clados (Figura 7).

De acuerdo con los resultados obtenidos, las muestras de murciélagos que presentaron mayor infección por los linajes de *T. spp.* Neobats se identificaron en los géneros *Artibeus* y *Carollia*. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Dario et al., (2017a), quienes han precisado que las especies de estos géneros son los más abundantes en el neotrópico, además sus dietas y hábitat facilitan la exposición a potenciales vectores de parásitos. Pese a que se conoce que los Triatomíneos no son vectores de parásitos clasificados como *T. spp.* Neobats, aún se desconocen sus vectores y ciclo de vida (Moreia et al., 2021). Cabe destacar que el linaje *T. sp.* Neobat 3 presentó una amplia variedad de hospederos en comparación con lo reportado en otros estudios (por ejemplo, Barros et al., (2019); Dario et al., (2017a) y Lima et al., (2015)); además éste se encontró en cinco

de las siete localidades evaluadas; teniendo en cuenta lo anterior *T. sp. Neobat 3* puede estar presentando un papel importante en la infección por linajes de parásitos *T. sp. Neobat* en los murciélagos de esta región del nororiente colombiano. Por último, y no siendo menos importante, el linaje *T. sp. Neobat 4*, el cual infecta exclusivamente a murciélagos del género *Carollia* (Moreia et al., 2021), en el presente estudio se determinó que además infecta individuos del género *Anoura* (Tabla 5, Figura 7); este hallazgo constituye el primer registro de infección de dicho linaje en murciélagos de un género diferente a *Carollia*.

La independencia entre el sexo y el número de individuos infectados ( $\chi^2 = 0,96248$ ; 1 grado de libertad,  $p = 0,3266$ ) concuerda con lo reportado por Herrera (2018) y Torres-Castro et al., (2021). Por su parte Herrera (2018) sustentó sus hallazgos en el comportamiento social como factor importante para la infección. En este sentido las poblaciones con comportamiento gregario podrían influir en la infección por el parásito, a razón de la constante agrupación de los individuos debido a su comportamiento sociabilidad y especialmente por las colonias de maternidad (Webber & Willis, 2016). A la luz de la idea que la infección podría darse por el comportamiento gregario de los murciélagos, de las especies infectadas (Tabla 4), como *C. perspicillata*, *M. molossus* y *A. geoffroyi*, que se suelen agrupar en colonias numerosas (Peñuela-Salgado & Pérez-Torres, 2015; Vásquez-Parra et al., 2015; Romero, 2022); *P. hastatus*, que no cambian la composición de los miembros por largos periodos de tiempo (Cortés & Jiménez, 2014), lo que facilitaría el contacto del vector a los hospederos en un tiempo más corto (Webber & Willis, 2016). En las otras especies donde fue identificada infección como las del género *Artibeus* y *Uroderma*, que suelen agruparse en grupos pequeños otros factores podrían estar influyendo la infección es el tipo de refugios empleados (Ramírez et al., 2014). Para el caso de Torres-Castro (2021), quienes no sustentan sus hallazgos, estos no muestran diferencias significativas en el sexo, tal como se identifica en el presente trabajo.

La secuencia de *R. nasua* identificada en muestra de *C. perspicillata*, guarda identidad del 97% con la secuencia código AY998642.1 alojada en el Gen Bank. Este organismo es un protozoo de la clase Kinetoplasta, orden Neobodonida, que se caracteriza por ser de vida libre que explota ambientes como estanques de agua y dieta heterótrofos alimentándose principalmente de bacterias (Scheckenbach et al., 2005). Esta especie de protozoo no se ha reportado como parásito; sin embargo, no constituye el primer reporte de protozoos de vida libre que se haya detectado mediante secuencias del gen RNA ribosomal 18S en sangre de murciélagos.

En el sentido expuesto anteriormente, Dario et al., (2017b) en Brasil detectaron en una muestra de *D. rotundus* la especie de protozoo *Bobo saltan* perteneciente al clado Eubodonida, grupo hermano de Neobodonida. Estos autores no descartaron la posible contaminación ambiental de ADN de los flagelados de protistas al momento de tomar la muestra en campo. Por su parte Szöke et al., (2017) reportaron secuencias del protozoo *Bobo saltan* en garrapatas de la especie *Ixodes simplex* que les desprendieron a murciélagos de la especie *Miniopterus schreibersii* en Rumania. Adicionalmente, identificaron al protozoo *Bodonidae spp*, perteneciente al clado Neobodonida, en *Argar vespertilionis*, ectoparásito de la especie *Myotis brandtii*, muestreado en Hungría. Estos autores descartaron la posibilidad de que los ectoparásitos se infectaran con estos protozoos por medio distinto a la ingesta de sangre de los hospederos, debido a su dieta estrictamente hematófaga. Además, argumentaron que todas las especies de murciélagos dependen de los cuerpos de agua dulce disponibles para beber (Greif & Siemers, 2010); lo cual conllevaría a la ingesta de bodonidos.

Los estudios de alimentación humana y animal han demostrado que el ADN dietético fragmentado puede resistir el proceso digestivo (Rizzi et al., 2012) e incluso los genes completos pueden traspasar la barrera intestinal (Spisák et al., 2013). Teniendo en cuenta este escenario, Szöke et al., (2017) plantearon la hipótesis que los murciélagos tienen acceso a bodonidos de vida libre y

al menos el ADN de estos organismos ingresa a través de la mucosa orofaríngea o gastrointestinal de los murciélagos hacia su sistema circulatorio. Dado el hecho que *R. nasua* fue identificado en una muestra de *C. perspicillata*, especie de murciélago que suele beber de cuerpos de agua dulce, a luz de lo descrito por Szöke et al., (2017), la hipótesis del acceso a bodónidos por ingesta de agua dulce y posterior ingreso a mucosas de los murciélagos, podría explicar dicho hallazgo.

## 7. Conclusiones

A partir de la obtención y análisis de secuencias del gen ARNr 18S de parásitos tripanosomátidos presentes en muestras sanguíneas de individuos de distintas especies de murciélagos muestreadas en el departamento de Santander, se concluye que:

La frecuencia de infección por *Trypanosoma* fue de 11% en 233 muestras analizadas. Este muestreo comparativamente es mayor al de otros estudios de esta índole realizados en Colombia.

El 75% de las secuencias de los trypanosomatideos detectados corresponden al clado *T. spp.* Neobats, denotando un papel importante en la infección de parásitos del género *Trypanosoma* en las poblaciones de murciélagos en la región nororiental de Colombia.

El alto valor de identidad de las secuencias obtenidas (92% a 99.9%) permitió la identificación de tres especies de parásitos tripanosomatidos y cuatro linajes *T. sp.* Neobat que permiten constituir el reporte de infección en especies de quirópteros por primera ocasión para el neotrópico de: *Trypanosoma dionisii* en la especie *R. io*; *T. wauwau* en *L. brasiliensis*; *T. sp.* Neobat 1 en *L. brasiliensis*; *T. sp.* Neobat 3 en *U. convexum*, *M. molossus*, *A. planirostris* y *S. cf.tildae*; *T. sp.* Neobat 4 en *A. geoffroyi* y *T. sp.* Neobat 5 en *C. perspicillata*. Adicionalmente, *Trypanosoma dionisii* en la especie *S. cf.tildae* reporte de infección por primera ocasión para Colombia y para el

departamento de Santander de *T. cruzi* en *P. hastatus* y *M. molossus*. Esta amplia diversidad de linajes y especies del género *Trypanosoma* como de especies de murciélagos expone que las localidades presentan singularidades que favorecen el establecimiento de interacciones parásito-hospedero, además que los murciélagos cumplen un papel importante en la diversificación y ciclos de transmisión de estos parásitos en esta región del país. Lo anterior revela la necesidad de profundizar en futuras investigaciones que evalúen los factores ecológicos y epidemiológicos involucrados en las transmisiones de tripanosomátidos en poblaciones de quirópteros en estos ecosistemas.

Con una identidad de 97% se identificó una secuencia del protozooario de vida libre *Rhynchomonas nasua* en muestra sanguínea de *C. perpicillata*; este hallazgo permitiría la ampliación en la búsqueda de microorganismos que interactúan con quirópteros y que amplíen aspectos desconocidos de la ecología de estos organismos, además de poner en entredicho la especificidad de las secuencias cebadoras de parásitos tripanosomátidos.

Recomendaciones:

Para estudios posteriores que se realicen en el departamento de Santander, se recomienda:

- Evaluar la dinámica de infección teniendo en cuenta gradientes de fragmentación de las áreas evaluadas y en diferentes hospederos puesto que cada hábitat presenta diferentes características que pueden estar asociadas con el proceso de infección.
- Para poder dilucidar que tipo de DTUs está involucrado en la infección de los murciélagos en la localidad evaluadas sería recomendable utilizar cebadores más específicos como el *cyt b* que permita dilucidar esta información.
- Evaluar los factores ecológicos y epidemiológicos involucrados en las transmisiones de tripanosomátidos en poblaciones de quirópteros en estos ecosistemas.
- A la luz del hallazgo del protozoario del orden Neobodonida, abre la interrogante de la especificidad de los cebadores usado para la identidad de tripanosomátidos, por ende, se sugiere el implemento de cebadores más específicos u otros genes más conservado para la identificación de estos parásitos.

## 8. Bibliografía

- Acosta, I. D. C. L., Costa, A. P. D., Gennari, S. M., & Marcili, A. (2014). Survey of Trypanosoma and Leishmania in wild and domestic animals in an atlantic rainforest fragment and surroundings in the state of Eespírito Santo, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 51(3), 686–693. <https://doi.org/10.1603/ME13177>.
- Aguiar L.M.S. & Y. Antonini. (2008). Diet of two sympatric insectivores bats (Chiroptera: Vespertilionidae) in the Cerrado of Central Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 25(1):28–31. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752008000100005>.
- Alvarez, J., Willig, M. R., Jones, K., & Webster, D. (1991). Glossophaga soricina. *Mammalian Species*, 379(December), 1–6.
- Alberico, M., Saavedra-R, A. C., & García-paredes, H. (2005). Murciélagos caseros de cali (valle del cauca - colombia). *Caldasia*, 27(1), 39321.
- Amórtegui-Hernández.(2022). *Evaluación de la diversidad de parásitos del orden Trypanosomatida que infectan murciélagos en diferentes ecorregiones de Colombia Presentado*.
- Amórtegui, D. M. (2018). Evaluación de prevalencia de parásitos tripanosomátidos de importancia médica (Leishmania y Trypanosoma cruzi) en murciélagos de Tauramena, Casanare y Bocas del Carare, Santander
- Añez, N., Crisante, G., & Soriano, P. (2009). Acta Tropica Trypanosoma cruzi congenital transmission in wild bats. *Acta Tropica*, 109, 78–80. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.08.009>
- Arias, E., & Pacheco, V. (2019). Dieta y estructura trófica de un ensamblaje de murciélagos en los

- bosques montanos del Santuario Nacional Pampa Hermosa, Junín, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 26(2), 169–182. <https://doi.org/10.15381/rpb.v26i2.16375>
- Argibay, H. D., Orozco, M. M., Cardinal, M. V., Rinas, M. A., Arnaiz, M., Segura, C. M., & Gürtler, R. E. (2016). First finding of *Trypanosoma cruzi* II in vampire bats from a district free of domestic vector-borne transmission in Northeastern Argentina. *Parasitology*, 143, 1358–1368. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000925>
- Aroca, A. K., González, L. Á., Hurtado, M. A., & Murillo García, O. E. (2016). Preferencia en la dieta de murciélagos frugívoros (Phyllostomidae) en un fragmento de bosque seco tropical. *Revista de Ciencias*, 20(2), 8. <https://doi.org/10.25100/rc.v20i2.4607>
- Austen, J. M., & Barbosa, A. D. (2021). Diversity and epidemiology of bat trypanosomes: A one health perspective. *Pathogens*, 10(9), 1–26. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091148>
- Austen, J. M., Dea, M. O., Jackson, B., & Ryan, U. (2015). High prevalence of *Trypanosoma vegrandis* in bats from Western Australia. *Veterinary Parasitology*, 214(3–4):342–347.
- Banyard, A., Hayman, D., Johnson, N., Mcelhinney, L., & Fooks, A. (2011). *Bats and Lyssaviruses*. Advances in Virus Research (Vol. 79). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387040-7.00012-3>.
- Barriga, O. (2003). Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Parasitoses. In *Organizacion Panamericana de la Salud* (Issue 580).
- Barros, J. H. S., Lima, L., Schubach, A. O., & Teixeira, M. M. G. (2019). *Trypanosoma madeirae* sp. n.: A species of the clade *T. cruzi* associated with the neotropical common vampire bat *Desmodus rotundus*. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 8(November 2018), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.12.009>
- Baruch, W. (2013). *Parasitología humana*. Mexico: McGRAW-HILL Interamericana
- Bejarano-Bonilla, D. a, Yate-Rivas, a, & Bernal-Bautista, M. H. (2007). Bat diversity and

- distribution along an altitudinal transect in the Tolima region of Colombia. *Caldasia*, 29(2), 297–308.
- Berrizbeitia, M., Concepcion, J. L., Carzola, V., Rodríguez, J., Cáceres, A., & Quiñones, W. (2012). Seroprevalencia de la infección por Trypanosoma cruzi en Canis familiaris del estado Sucre, Venezuela. *Biomédica*, 33(2). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i2.760>
- Belt, L. A. (2018). Bats and human health: Ebola, SARS, Rabies and Beyond. In *Biologist* (Vol. 55, Issue 2). <https://doi.org/10.1002/9781119150060>
- Botero, D., & Restrepo, M. (2012). *Parasitosis Humanos*. Medellín, Colombia: Corporación Para Investigaciones Biológicas.
- Bower, S. M., & Woo, P. T. K. (1981). Two new species of trypanosomes (subgenus Schizotrypanum) in bats from southern Ontario. *Canadian Journal of Zoology*, 59(3), 530–545. <https://doi.org/10.1139/z81-077>
- Brito, J., Camacho, M. A., Romero, V., Vallejo, A. F. (2021). Mamíferos del Ecuador. Versión 2021.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/mammaliaweb/>.
- Brook, C. E., & Dobson, A. P. (2015). Bats as ‘ special ’ reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends in Microbiology*, 23(3), 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.004>
- Cáceres, A., Vega, S., Pinto, J., Anca, J., Arevale, H., & Nàquira, C. (2005). *Vectores de la trypanosomiosis americana en huallaga y picota, San Martín – Perú*.
- Calderon-Acevedo, C. A., Rodriguez-Posada, M. E., & Muchhala, N. (2021). Morphology and genetics concur that Anoura carishina is a synonym of Anoura latidens (Chiroptera, Glossophaginae). *Mammalia*, 85(5), 471–481. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2020-0183>
- Calderón, W., & Pacheco, V. (2012). First report of Artibeus bogotensis Andersen, 1906

(Chiroptera: Phyllostomidae) for Peru. *Check List*, 8(6), 1333–1336.  
<https://doi.org/10.15560/8.6.1333>

Carlos Erazo, N. (2015). Evaluación De Potenciales Reservorios Silvestres De Trypanosoma Sp. En Cuatro Localidades De Los Departamentos De Amazonas Y Loreto. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.

Cassalett, E. R., Alfonso, V. J., Parra A, J. L., & Baldrich F, R. M. (2011). Diagnóstico y caracterización molecular de infecciones naturales por Trypanosoma spp. en bovinos de la Orinoquía Colombiana. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(1), 86–91.

Cavazzana, M., Marcili, A., Lima, L., Maia, F., Junqueira, Â. C. V., Veludo, H. H., Viola, L. B., Campaner, M., Nunes, V. L. B., Paiva, F., Coura, J. R., Camargo, E. P., & Teixeira, M. M. G. (2010). Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear ( *ssrRNA* and *gGAPDH* ) and mitochondrial ( *Cyt b* ) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *International Journal for Parasitology*, 40(3), 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.08.015>

Clements, D. N., Wood, S., Carter, S. D., & Ollier, W. E. R. (2008). Assessment of the quality and quantity of genomic DNA recovered from canine blood samples by three different extraction methods. *Research in Veterinary Science*, 85, 74–79.  
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.09.009>

Cortés, N., & Jiménez, L. (2014). Descripción De Un Refugio Usado Por *Phyllostomus Hastatus* ( Chiroptera : Phyllostomidae ) En La Serranía Del Perijá, La Guagira, Colombia. *Revista Ciencia e Ingeniería*, 2(1), 52–54.

Cottontail, V. M., Kalko, E. K. V., Cottontail, I., & Wellinghausen, N. (2014). High Local Diversity

- of Trypanosoma in a Common Bat Species , and Implications for the Biogeography and Taxonomy of the *T. cruzi* Clade. 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108603>
- Cottontail, V. M., Wellinghausen, N., & Kalko, E. K. V. (2009). Habitat fragmentation and haemoparasites in the common fruit bat, *Artibeus jamaicensis* (Phyllostomidae) in a tropical lowland forest in Panam. *Parasitology*, 136(10), 1133–1145. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990485>
- da Silva, M., Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Ortiz, P. A., Campaner, M., Takeda, G. F., Paiva, F., Nunes, V. L. B., Camargo, E. P., & Teixeira, M. M. G. (2009). Trypanosoma rangeli isolates of bats from Central Brazil : Genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Tropical*, 109, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.11.005>
- D’Avila-Levy, C., Boucinha, C., Kostygov, A., Lúcia, H., Santos, C., Morelli, K. A., Gybchukleremenko, A., Duval, L., Votýpka, J., Yurchenko, V., Grelleir, P., Lukeš, J. (2015). Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(8), 956–965. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150253>
- Da Costa, A., Nunes, P., Santos, H., Ferreira, L., Tonhosolo, R., Ruchert, A., De Rocha, P., Cotrim, C., Gennari, S., Maicii, A. (2016). Diversity of bats trypanosomes in Hydroelectric area of Belo Monte in Brazilian Amazonia. *Acta Tropica*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.08.033>
- Da Costa, A. P., Costa, F. B., Soares, H. S., Ramirez, D. G., De Carvalho Mesquita, E. T. K., Gennari, S. M., & Marcili, A. (2015). Trypanosoma cruzi and Leishmania infantum chagasi Infection in Wild Mammals from Maranhão State, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic*

*Diseases*, 15(11), 656–666. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1771>

Dario, M. A., Lisboa, C. V., Costa, L. M., Moratelli, R., Nascimento, M. P., Costa, L. P., Luiz, Y., Leite, R., Roque, L. R., Llewellyn, S., Cristina, S., & Jansen, M. (2017a). High Trypanosoma spp . diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state , Brazil. *Plos one*, 12(11): <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188412>

Dario, M. A., Moratelli, R., Schwabl, P., Jansen, A. M., & Llewellyn, M. S. (2017b). Small subunit ribosomal metabarcoding reveals extraordinary trypanosomatid diversity in Brazilian bats. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005790>

Dario, M. A., Rodrigues, M. S., Barros, J. H. D. S., Xavier, S. C. D. C., D'Andrea, P. S., Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2016). Ecological scenario and Trypanosoma cruzi DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1754-4>

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2 : more models , new heuristics and parallel computing CircadiOmics : integrating circadian genomics , transcriptomics , proteomics. *Nature Methods*, 9(8), 2106. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

Davis, W. (1976). Notes on the Bats Saccopteryx canescens Thomas and Micronycteris hirsuta ( Peters ). *Journal of Mammalogy*, 57(3), 604–607.

de Jesus, R. F., Rodrigues, G. M., Silva, E. M., Borges Carneiro, A. J., Franke, C. R., Cunha, R. de M., & Pita Gondim, L. F. (2017). Toxoplasmatinae Parasites in Bats from Bahia State , Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*, 53(1), 1–4. <https://doi.org/10.7589/2016-03-065>

de Oliveira, P., Gómez-Hernández, C., Barbosa, C., Rezende-Oliveira, K., Pedrosa, A., Ramirez, J.D., Ramirez, L.E., (2018). Bat trypanosomatids (first report of T. wauwau) in Triangulo Mineiro. Brazil. bioRxiv. 347146 <https://doi.org/10.1101/347146>.

- Delgado S., E., Herrera S. M.-T., Pavía, P., Pérez T., J., & Cuervo, C. L. (2016). Trypanosoma cruzi infection in the heart of Colombian wild bats [Poster]. 17th International Congress on Infectious Diseases / International Journal of Infectious Diseases 45S (2016) 1–477  
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.02.768>
- Díaz, M., Solari, S., Aguirre, L. ., Aguilar, L., & Barquez, R. (2016). Clave de identificación de los murciélagos de Sud-america. Tucumán, Argentina: Publicación Especial N°2, PCMA (Programa de Conservación de los murciélagos de Argentina ), 160 p
- Duarte, L. F., Flórez, O., Rincón, G., & González, C. I. (2014). Comparison of seven diagnostic tests to detect Trypanosoma cruzi infection in patients in chronic phase of Chagas disease. *Colombia Médica*, 45(2), 61-66.
- Echavarría-R, J., Jiménez-O, A., Palacios-M, L., & Rengifo-M, J. (2018). Diversidad y composición de murciélagos (Mammalia: Chiroptera) en el municipio de Acandí, Chocó - Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 10(1), 7–14.  
<https://doi.org/10.24188/recia.v10.n1.2018.628>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M. M. G., & Shaw, J. J. (2018). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. *Parasitology*, 145(4), 430–442.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182016002092>
- Estrada-Villegas, S., Pérez-Torres, J., & Stevenson, P. R. (2010). Ensamblaje de murciélagos en un bosque subandino colombiano y análisis sobre la dieta de algunas especies. *Mastozoología Neotropical*, 17(1), 31–41.

- Estrada, A., & Coates-Estrada, R. (2002). Bats in continuous forest, forest fragments and in an agricultural mosaic habitat-island at Los Tuxtlas, Mexico. *Biological Conservation*, 103(2), 237–245. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(01\)00135-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(01)00135-5)
- Ferrer, E., Lares, M., Viettri, M., & Medina, M. (2013). Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(5), 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.09.007>
- Ferri, G. (2022). Rol de la señalización mediada por AMPc en el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* y en célula hospedadora durante la invasión. (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires).
- García, L., Ortiz, S., Osorio, G., Torrico, M. C., Torrico, F., & Solari, A. (2012). Phylogenetic analysis of Bolivian bat trypanosomes of the subgenus schizotrypanum based on cytochrome b sequence and minicircle analyses. *PLoS ONE*, 7(5), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036578>
- Gardner, A. (2007) *Mammals of South América*. London: The University of Chicago Press
- Gardner, R. A., & Molyneux, D. H. (1988). Schizotrypanum in British bats. *Parasitology*, 97(1), 43–50. <https://doi.org/10.1017/S0031182000066725>
- González Andrade F y Martínez Jarreta MB. Recolección y Conservación de muestras (2001). *Técnicas Instrumentales en Genética Forense*. Colección Orfila Rotger, Ciencias Forenses; Institución Fernando el Católico, Zaragoza.
- Greif, S. & Siemers, B. M. (2010): Innate recognition of water bodies .in echolocating bats. *Nat. Commun.* 1(1), 107. <https://doi.org/10.1038/ncomms1110>
- Grisard, E. C. (2002). Kinetoplastid Biology and Disease Salivaria or Stercoraria? The *Trypanosoma rangeli* dilemma. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2, 1–2.

- Guhl R, & Vallejo GA. (2003). *Trypanosoma* (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920: An Updated Review. *Meórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98(4):435-442.
- Guhl, F. (2009). Enfermedad de Chagas : Realidad y perspectivas. *Red Biome*, 20(18), 228–234.
- Guhl, F., & Ramírez, J. D. (2011). *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision? *Acta Tropica*, 119(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.002>
- Hajian-Tilaki, K. (2011). Sample size estimation in epidemiologic studies. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 2(4), 289–298.
- Hamilton, P. B., Cruickshank, C., Stevens, J. R., Teixeira, M. M. G., & Mathews, F. (2012). Parasites reveal movement of bats between the New and Old Worlds. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63(2), 521–526. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.01.007>
- Hamilton, P. B., Gibson, W. C., & Stevens, J. R. (2007). Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.03.023>
- Hamilton, P. B., Stevens, J. R., Gaunt, M. W., Gidley, J., & Gibson, W. C. (2004). Trypanosomes are monophyletic: Evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology*, 34(12), 1393–1404. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.08.011>
- Hamilton, P., Adams, E., Njiokou, F., Gibson, W., Cuny, G., & Herder, S. (2009). Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. *Infection, Genetics and Evolution*, 9, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.01.006>
- Hart, Robert D. (1985). *Conceptos básicos sobre agroecosistemas* (No.1). Bib. Orton IICA/CATIE.
- Herrera, M. (2018). Relación entre las características ecológicas de murciélagos de la cueva

macaregua en Santander (Colombia) y la presencia de tripanosomátidos. [Tesis de pregrado, maestría, Pontificia Universidad Javeriana].

Hernández, C., da Rosa, J. A., Vallejo, G. A., Guhl, F., & Ramírez, J. D. (2020). Taxonomy, evolution, and biogeography of the rhodniini tribe (Hemiptera: Reduviidae). *Diversity*, *12*(3), 1–28. <https://doi.org/10.3390/d12030097>.

Hernandez, R., & Rivas, R. H. (1993). *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes : a review. *Biol Res*, *26*, 109–114.

Hoare, CA. (1972). *The Trypanosomes of Mammals*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Hodgkison, R., Balding, S., Zubaid, A., & Kunz, T. (2013). Fruit Bats ( Chiroptera : as Seed Dispersers and Pteropodidae ) Lowland in a Malaysian Pollinators Rain Forest ', *35*(4), 491–502. 563–573.

Hollis, L. (2005). *Artibeus planirostris*. *Mammalian Species*, *46*(April), 16–23. <https://doi.org/10.1644/775/2600520>

Humboldt Instituto. (2021, January). *La hoja de ruta para que Colombia estudie los sonidos de sus 200 especies de murciélagos*. Instituto Humboldt. <http://www.humboldt.org.co/es/boletines-y-comunicados/item/1575-la-hoja-de-ruta-para-que-colombia-estudie-los-sonidos-de-sus-200-especies-de-murcielagos>.

Jaimes-Dueñez, J., Jiménez-Leaño, Á. P., Esteban-Mendoza, M., Moreno-Salcedo, L. A., Triana-Chávez, O., & Cantillo-Barraza, O. (2020a). Epidemiological and clinical characteristics of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs (*Canis lupus familiaris*) from a Chagas Disease-Endemic Urban Area in Colombia. *Preventive Veterinary Medicine*, *182*. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105093>

Jaimes-Dueñez, J., Cantillo-Barraza, O., Triana-Chávez, O., & Mejía Jaramillo, A. M. (2020b).

- Molecular surveillance reveals bats from eastern Colombia infected with *Trypanosoma theileri* and *Trypanosoma wauwau* -like parasites. *Preventive Veterinary Medicine Journal*, 184(52).  
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105159>
- Jansen, A. M., Cristina, S., Luiz, A., & Roque, R. (2018). *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. 1–25.
- Jaramillo, N., & Moreno, J. (1987). Ailamiento de *Trypanosoma*(*Schizotrypanum*) *vespertilionis* en murciélagos de la zona de Rio de Claro, departamento de Antioqui, Colombia. *Actualidades Biologicas*, 16(59).
- Jarrín, V., P. (2005). Forma, tamaño y estructura: Aspectos ecológicos, consecuencias evolutivas y ejemplos en los murciélagos ecuatorianos. *Revista de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador* 76:125- 146.
- Jovani, R., & Tella, J. L. (2006). Parasite prevalence and sample size: misconceptions and solutions. *Trends in Parasitology*, 22(5), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.011>
- Kalko, E.K.V. (1998). Organisation and diversity of tropical bat communities through space and time. *Zoology* 101:281- 297.
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., & Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites and Vectors*, 10(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>.
- Keessing, F., Holt, R., & Ostfeld, R. (2006). Reviews and Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters*, 9, 485–498. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00885.x>
- Kingston, T. (2010). Research priorities for bat conservation in Southeast Asia : a consensus approach 1 C. *Biodivers Conserv*, 19, 471–484. <https://doi.org/10.1007/s10531-008-9458-5>.
- Kramvis, A., Bukofzer, S., & Kew, M. C. (1996). Comparison of hepatitis B virus DNA extractions from serum by the QIAamp blood kit, GeneReleaser, and the phenol-chloroform method.

*Journal of Clinical Microbiology*, 34(11), 2731–2733.

<https://doi.org/10.1128/jcm.34.11.2731-2733.1996>

Lai, D. H., Hashimi, H., Lun, Z. R., Ayala, F. J., & Lukes, J. (2008). Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 1999–2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711799105>

Leonard, G., Soanes, D. M. and Stevens, J. R. (2011). Resolving the question of trypanosome monophyly: a comparative genomics approach using whole genome data sets with low taxon sampling. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 955–959.

Lima, L., Espinosa-álvarez, O., Hamilton, P. B., Neves, L., Takata, C. S. A., Campaner, M., Attias, M., Souza, W. De, Camargo, E. P., & Teixeira, M. M. G. (2013). *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasites & Vectors*. 6, 1–17.

Lima, L., Espinosa-álvarez, O., Pinto, C.M., Cavazzana, M., Pavan, A.C., Carranza, J.C., Lim, B.K., Campaner, M., Takata, C.S., Camargo, E.P., Hamilton, P.B., Teixeira, M. M., (2015). New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical *Pteronotus* bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. *Parasit. Vectors* 8, 657.

Lima, L., Silva, F. M. da, Neves, L., Attias, M., Takata, C. S. A., Campaner, M., de Souza, W., Hamilton, P. B., & Teixeira, M. M. G. (2012). Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: Morphological, Developmental and Phylogenetic Evidence of a New Species, *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *erneyi* sp. nov., in African Bats Closely Related to *Trypanosoma*

(Schizotrypanum) cruzi and Allied Species. *Protist*, 163(6), 856–872.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.protis.2011.12.003>

Lopes, A. H., Souto-Padrón, T., Dias, F. A., Gomes, M. T., Rodrigues, G. C., Zimmermann, L. T.,

Alves e Silva, T. L., & Vermelho, A. B. (2010). Trypanosomatids: Odd organisms, devastating diseases. *Open Parasitology Journal*, 4(SPEC. ISS.1), 30–59.

<https://doi.org/10.2174/1874421401004010030>

López-Antuñano, F., Rangel-Florez, H., & Ramos, C. (2000). Diagnosis of Chagas ' Disease.

*Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42, 121–129

López-Cancino, S. A., Tun-Ku, E., De la Cruz-Felix, H. K., Ibarra-Cerdeña, C. N., Izeta-Alberdi,

A., Pech-May, A., Mazariegos-Hidalgo, C. J., Valdez-Tah, A., & Ramsey, J. M. (2015).

Landscape ecology of Trypanosoma cruzi in the southern Yucatan Peninsula. *Acta Tropica*, 151, 58–72. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.021>

Lourenço, J. L. (2016). *Ocorrência de tripanossomatídeos em morcegos ( Mammalia : Chiroptera ) no Distrito Federal , Brasil .*

Lourenço, J. L. M., Minuzzi-Souza, T. T. C., Silva, L. R., Oliveira, A. C., Mendonça, V. J., Nitz,

N., Aguiar, L. M. S., & Gurgel-Gonçalves, R. (2017). High frequency of trypanosomatids in gallery forest bats of a Neotropical savanna. *Acta Tropica*, 177, 30.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.012>

Lourenço, J. L. M., Minuzzi-Souza, T. T. C., Silva, L. R., Oliveira, A. C., Mendonça, V. J., Nitz,

N., Aguiar, L. M. S., & Gurgel-Gonçalves, R. (2018). High frequency of trypanosomatids in gallery forest bats of a Neotropical savanna. *Acta Tropica*, 177(October 2017), 200–206.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.012>

Lozano, A. J. (2014). Diversidad funcional y estructura trófica de un ensamblaje de murciélagos

filostómidos en el parque nacional natural Serranía de los Yariguíes.

Luis, A. D., Hayman, D. T. S., O'Shea, T. J., Cryan, P. M., Gilbert, A. T., Pulliam, J. R. C., Mills, J. N., Timonin, M. E., Willis, C. K. R., Cunningham, A. A., Fooks, A. R., Rupprecht, C. E., Wood, J. L. N., & Webb, C. T. (2013). A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: Are bats special? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1756). <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>

Mammal Diversity Database. (2022). Mammal Diversity Database (1.9) [Data set]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6407053>

Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Junqueira, A. C. V., Veludo, H. H., Maia Da Silva, F., Campaner, M., Paiva, F., Nunes, V. L. B., & Teixeira, M. M. G. (2009a). A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, 136(6), 641–655. <https://doi.org/10.1017/S0031182009005861>

Marcili, A., Lima, L., Valente, V. C., Valente, S. A., Batista, J. S., Junqueira, A. C. V., Souza, A. I., da Rosa, J. A., Campaner, M., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Miles, M. A., & Teixeira, M. M. G. (2009b). Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIc: New hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1265–1274. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.07.003>.

Marinkelle, C. (1980). Prevalence of *Trypanosoma cruzi*-like infection of Colombian bats. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 76(2), 125–134

Marinkelle, C.J., (1977). *Trypanosoma (Herpetosoma) longiflagellum* sp. n. from the tomb bat, *Taphozous nudiventris*, from Iraq. *J. Wildlife Dis.* 13, 262–264.

Marinkelle, C. J. (1982). *Prevalence of Trypanosoma cruzi-like infection of Colombian bats*

*Prevalence of Trypanosoma cruzi-like infection of Colombian bats.* 4983(March).

<https://doi.org/10.1080/00034983.1982.11687517>

Marinkelle, & Duarte. (1968). *Trypanosoma pifanoi* n. sp. from Colombian Bats. *Journal Protozool*, 3(15), 621–627.

Mateus, J., Gómez, N., Herrera-Sepúlveda, M. T., Hidalgo, M., Pérez-Torres, J., & Cuervo, C. (2019). Bats are a potential reservoir of pathogenic leptospira species in Colombia. *Journal of Infection in Developing Countries*, 13(4), 278–283. <https://doi.org/10.3855/jidc.10642>

Miles, M. A., Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., Mauricio, I. L. (2009). The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania* : looking back and to the future. *Parasitology* (2009), 136, 1509–1528. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990977>

Ministerio de Salud y Protección Social. (2013). *Enfermedad de chagas*.

Minter-Goedbloed, E., Minter, D. ., Cadena, A., & Howells, R. . (1987). First record of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* from the western Amazon basin, Caquetá, Colombia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(1980), 1980.

Molinari, J., Nassar, J., Garcia, A., & Márquez, R. (2012). Singularidad biológica e importancia socioeconómica de los murciélagos cavernícolas de la Península de Paraguaná , Venezuela ,con Propuestas para su Conservación. *Revista de Ecología Latino-Americana*, 17(3), 1–40.

Morales-Martínez, D., & Díaz, D. (2020). Evaluación rápida de la diversidad de murciélagos (Mammalia: Chiroptera) en un gradiente altitudinal andino-amazónico en el Parque Andakí (Caquetá, Colombia). *Revista Colombia Amazonica*, 12, 94–108.

Moratelli, R., Gardner, A. L., Oliveira, J. A. D. E., & Wilson, D. O. N. E. (2013). Review of *Myotis* (Chiroptera, Vespertilionidae) from northern South America, including description of a new

species. *American Museum Novitates*, 3780, 1–36.

Moreno, J. (2017). Aves de la UIS. En *Colores al vuelo*. (Págs.: 163-230). Publicaciones UIS

Moreia, F., Azeredo Rangel, D., Messias Vilar, E., Galvão Pavan, M., Moratelli, R.,

RodriguesRoque, A. L., & Jansen, A. M. (2021). Trypanosoma spp. Neobats: Insights about those poorly known trypanosomatids. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 16(July), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.09.003>.

Muñoz, J. (1990). Diversidad y hábitos alimenticios de murciélagos en transectos altitudinales a través de la cordillera Central de los Andes en Colombia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 25, 1-17.

Muñoz, J. (1993). Murciélagos del norte de Antioquia (Colombia). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 28, 83-93.

Muratore, C., & Baranchuk, A. (2010). Current and emerging therapeutic options for the treatment of chronic chagasic cardiomyopathy. *Vascular Health and Risk Management*, 6, 593–601.

Nodarse, J. F., Alvarez, A. M. M., Auwera, G. Van Der, & Maes, I. (2019). Aportes a la evolución y clasificación taxonómica de los géneros de importancia médica de la familia Trypanosomatidae basado en el análisis filogenético del gen de la proteína de choque térmico 70. *Anales de La Academia de Ciencias de Cuba*, 11(1).

Ondřej, B., Martin, Š., Helena, J., Tomáš, B., Maria, O., & Jitka, V. (2012). Transport of bugs of the genus Cimex ( Heteroptera : Cimicidae ) by bats in western Palaearctic. *Vespertilio*, 16(Horváth 1913), 43–54.

Oliveira, M.P., Cortez, M., Maeda, F.Y., Fernandes, M.C., Haapalainen, E.F., Yoshida, N., Mortara, R.A. (2009). Unique behavior of Trypanosoma dionisii interacting with mammalian cells: Invasion, intracellular growth, and nuclear localization. *Acta Trop.* 110, 65–74.

- Ortega, J., & Alarcón-D, I. (2008). Anoura Geoffroyi (Chiroptera: Phyllostomidae). *Mammalian Species*, 818, 1–7. <https://doi.org/10.1644/818.1>
- Palmezano, J., Plazas, L., River, K., & Rueda, V. (2015). Enfermedad de chagas : realidad de una patología frecuente en Santander , Colombia. *Medica Uis*, 28(1), 81–90.
- Patz ,J., Daszak, P.,Tabor, G., Aguirre,A., Pearl,M., Epstein,J., Wolfe,E.(2004). Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environ Health Perspec.*112:1092-1098.
- Peñuela-Salgado, M., & Pérez-Torres, J. (2015). Environmental and spatial characteristics that affect roost use by Seba’s short-tailed bat (Carollia Perspicillata) in a Colombian cave. *Journal of Cave and Karst Studies*, 77(3), 160–164. <https://doi.org/10.4311/2015LSC0105>
- Pérez-Torres, J., Sánchez-Lalinde, C., Cortés-Delgado, N., Rodríguez-Camargo, J. M., Niño, J. C., Pineda, J., & Ortiz, C. L. (2009). Murciélagos asociados a sistemas naturales y transformados en la ecorregión del eje cafetero. *Valoración de la biodiversidad en la Ecorregión del Eje Cafetero. Pereira: Ciebreg*, 157-167.
- Pinazo M, Espinosa G, Gallego M. (2010) Successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus. *Am J TropMed Hyg*;82:583-587
- Pinto, A., & da Costa, D. (1986). Trypanosoma Cruzi-Like bloodstream trypomastigote in bats from the state of Piaui, Northeastern Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 19(1), 31–34.
- Pinto, C. M. (2021). Tripanosomas que infectan mamíferos: Estado del arte en Ecuador y recomendaciones para su estudio. *Mammalia Aequatorialis*, 3(December), 13–21. <https://mamiferosdeecuador.com/mammalia-aequatorialis/index.php/boletin/article/view/12>
- Pinto, C. M., Kalko, E. K. V, Cottontail, I., Wellingshausen, N., & Cottontail, V. M. (2012). Infection

- , Genetics and Evolution TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone , with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(6), 1328–1332. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.013>
- Pinto, M., Ocaña-mayorga, S., Tapia, E. E., Lobos, S. E., Zurita, A. P., Aguirre-villacís, F., Macdonald, A., Villacís, A. G., Lima, L., Teixeira, M. M. G., Grijalva, M. J., & Perkins, S. L. (2015). *Bats , Trypanosomes , and Triatomines in Ecuador : New Insights into the Diversity , Transmission , and Origins of Trypanosoma cruzi and Chagas Disease*. 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139999>
- Racey ,P.A & Entwistle, A.C., (2003) Conservation ecology of bats. In: Kunz TH, Fenton MB (eds).Bat ecology. University of Chicago Press, Chicago, pp 680–743.
- Rodrigues, M. S., Lima, L., Xavier, S. C. das C., Herrera, H. M., Rocha, F. L., Roque, A. L. R., Teixeira, M. M. G., & Jansen, A. M. (2019). Uncovering *Trypanosoma* spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 8(February), 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.02.004>
- Romero, V. (2022). *Molossus molossus* En: Brito, J., Camacho, M. A., Romero, V. Vallejo, A. F. (eds). Mamíferos del Ecuador. Version 2018.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <https://bioweb.bio/faunaweb/mammaliaweb/FichaEspecie/Molossus%20molossus>,
- Ramírez-Chaves, H. E., Mejía-Egas, O., & Zambrano-G., G. (2008). Anotaciones sobre dieta, estado reproductivo, actividad y tamaño de colonia del murciélago mastín común (*Molossus molossus*: Molossidae) en la zona urbana de Popayán, Departamento del Cauca, Colombia. *Chiroptera Neotropical*, 14(2), 384–390.

- Ramírez-Silva, J. P., & Lugo-Gil, E. J. (2020). Murciélagos (chiroptera) en áreas verdes urbanas de la ciudad de tepic, nayarit, méxico. *Revista Mexicana de MASTOZOLOGÍA*, 21–31.
- Ramírez, J. D., Tapia-Calle, G., Muñoz-Cruz, G., Poveda, C., Rendón, L. M., Hincapié, E., & Guhl, F. (2014). Trypanosome species in neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infection, Genetics and Evolution*, 22, 28. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.022>
- Ramírez-Chaves H E, Suárez Castro A F, Morales-Martínez D M, Rodríguez-Posada M E, Zurc D, Concha Osbahr D C, Trujillo A, Noguera Urbano E A, Pantoja Peña G E, González Maya J F, Pérez Torres J, Mantilla Meluk H, López Castañeda C, Velásquez Valencia A, Zárrate Charry D (2021): Mamíferos de Colombia. v1.12. Sociedad Colombiana de Mastozoología. Dataset/Checklist. <https://doi.org/10.15472/kl1whs>
- Rassi, A.Jr., Rassi, A., & de Rezende, J. (2012). American Trypanosomiasis ( Chagas Disease ). *Infect Dis Clin N Am*, 26, 275–291.
- Reyes, M., Torres, Á., Esteban, L., Flórez, M., & Angulo, V. M. (2017). Riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas por intrusión de triatominos y mamíferos silvestres en Bucaramanga, Santander, Colombia. *Biomedica*, 37(1), 68–78. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3051>
- Ríos Sánchez, E., Calleros, E., González Zamora, A., Rubio, J., Martínez, O. C., Martínez, A., Hernández, S., & Pérez Morales, R. (2016). Comparative analysis of different DNA extraction methods and their genotyping efficiency in Mexican population. *Acta Universitaria*, 26(4), 56–65. <https://doi.org/10.15174/au.2016.1078>
- Rizzi, A., Raddadi, N., Sorlini, C., Nordgrd, L., Nielsen, K. M. and Daffonchio, D. (2012): The stability and degradation of dietary DNA in the gastrointestinal tract of mammals: implications for horizontal gene transfer and the biosafety of GMOs. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 52,

142–161.

- Ruelas, D. (2017). Diferenciación morfológica de *Carollia brevicauda* y *C. perspicillata* (Chiroptera: Phyllostomidae) de Perú y Ecuador. *Revista Peruana de Biología*, 24(4), 363–382. <https://doi.org/10.15381/rpb.v24i4.14063>
- Rocha, P. A., Tavares, V. D. C., Pedroso, M. A., Beltrão-Mendes, R., Ruiz-Esparza, J., & Ferrari, S. F. (2017). First record of *Dermanura anderseni* (Chiroptera, Phyllostomidae) for the Atlantic Forest. *Mammalia*, 82(4), 388–392. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2017-0034>
- Rodrigues, M. S., Lima, L., Xavier, S. C. D. C., Herrera, H. M., Rocha, F. L., Roque, A. L. R., Teixeira, M. M. G., & Jansen, A. M. (2019). Uncovering Trypanosoma spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 8, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.02.004>
- Rodríguez-Posada, M. E. (2010). Bats from a forest in the Central Andes of Colombia with notes on their taxonomy and distribution. *Caldasia*, 32(1), 205–220.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual* (3rd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scheckenbach, F., Wylezich, C., Weitere, M., Hausmann, K., & Arndt, H. (2005). Molecular identity of strains of heterotrophic flagellates isolated from surface waters and deep-sea sediments of the South Atlantic based on SSU rDNA. *Aquatic Microbial Ecology*, 38(3), 239–247. <https://doi.org/10.3354/ame038239>
- Schlegel, M., Ali, H. S., Stieger, N., Groschup, M. H., Wolf, R., & Ulrich, R. G. (2012). Molecular identification of small mammal species using novel cytochrome b gene-derived degenerated primers. *Biochemical Genetics*, 50(5–6), 440–447. <https://doi.org/10.1007/s10528-011-9487-8>

- Schijman, A. G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Mejia Jaramillo, A. M., Cura, C., Auter, F., Veron, V., Qvarnstrom, Y., Deborggraeve, S., Hajar, G., Zulantay, I., Lucero, R. H., Velazquez, E., Tellez, T., Leon, Z. S., Galvão, L., Nolder, D., ... Ladzins, J. (2011). International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000931>
- Siqueira, A. 1960. Estudos sobre a reacao de precipitina aplicada a identificao do sangue ingerido por triatomineos. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2: 41-53.
- Silva-Iturriza, A., Nassar, J. M., García-Rawlins, A. M., Rosales, R., & Mijares, A. (2013). *Trypanosoma evansi* kDNA minicircle found in the Venezuelan nectar-feeding bat *Leptonycteris curasoae* (Glossophaginae), supports the hypothesis of multiple origins of that parasite in South America. *Parasitology International*, 62(2), 95–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.10.003>
- Silva, M., Lima, L., Cristina, S., Maria, M., Teixeira, G., & Maria, A. (2019). Uncovering *Trypanosoma* spp . diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. *IJP: Parasites and Wildlife*, 8(February), 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.02.004>
- Solari, S., Muñoz-saba, Y., Rodríguez-mahecha, J. V, Defler, T. R., Ramírez-chaves, H. E., & Trujillo, F. (2013). V20N2a08. *Mastozoología Neotropical*, 20(2), 301–365.
- Sosa-Estani, S., Dri, L., Touris, C., Abalde, S., Dell'arciprete, A., & Braunstein, J. (2009). Transmision vectorial y congenita del *Trypanosoma cruzi* en Las Lomitas, Formosa. *Medicina*, 69(4), 424–430.
- Soto, H., Tibaduiza, T., Montilla, M., Triana, O., Suárez, D. C., Torres, M. T., Arias, M. T., & Lugo, L. (2014). Investigación de vectores y reservorios en brote de Chagas agudo por posible

transmisión oral en Aguachica, Cesar, Colombia. *Cadernos de Saude Publica*, 30(4), 746–756.

<https://doi.org/10.1590/0102-311X00024013>

Spisák, S., Solymosi, N., Ittész, P., Bodor, A., Kondor, D., Vattay, G., Barták, B. K., Sipos, F.,

Galamb, O., Tulassay, Z., Szállási, Z., Rasmussen, S., Sicheritz-Ponten, T., Brunak, S.,

Molnár, B. & Csabai, I. (2013): Complete genes may pass from food to human blood. *PLoS*

*ONE* 8, e69805

Steindel, M., Grisard, E., de Carvalho Pinto, C.J., Cordeiro F.D, Ribeiro-Rodrigues, R., & Romanha

A.J. (1998). Characterization of trypanosomes from the subgenus *Schizotrypanum* isolated

from bats, *Eptesicus* sp. (Chiroptera: Vespertilionidae), captured in Florianópolis, Santa

Catarina State, Brazil. *Journal of Parasitology*. 84(3):601–607.

Stevens, J. R., Noyes, H. A., Schofield, C. J., & Gibson, W. (2001). The Molecular Evolution of

Birds. *Biologi Italiani*, 24, 9–13.

Szöke, K., Sándor, A. D., Boldogh, S. A., Görföl, T., Votýpka, J., Takács, N., Estók, P., Kováts, D.,

Corduneanu, A., Molnár, V., Kontschán, J., & Hornok, S. (2017). DNA of free-living bodonids

(euglenozoa: Kinetoplastea) in bat ectoparasites: Potential relevance to the evolution of

parasitic trypanosomatids. *Acta Veterinaria Hungarica*, 65(4), 531–540.

<https://doi.org/10.1556/004.2017.051>

Szpeiter, B., Ferreira, J., Assis, F., Stelmachtchuk, F., Peixoto Junior, K., Ajzenberg, D., & Marcili,

A. (2017). Bat trypanosomes from Tapajós-Arapiuns Extractive Reserve in Brazilian Amazon.

*Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26(2), [https://doi.org/152–158](https://doi.org/152-158).

10.1590/s1984-29612017022.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

- Timm, R. M. (1959). *Artibeus phaeoti*. *Mammalian Species*, 40(4), 591–594.
- Teeling, E.C., Springer, M.S., Madsen, O., Bates, P., O'Brien, S.J., & Murphy, W.J., (2005). A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record. *Science* 307, 580-584.
- Torres-Castro, M., Cuevas-Koh, N., Hernández-Betancourt, S., Noh-Pech, H., Estrella, E., Herrera-Flores, B., Panti-May, J. A., Waleckx, E., Sosa-Escalante, J., & Peláez-Sánchez, R. (2021). Natural infection with *Trypanosoma cruzi* in bats captured in Campeche and Yucatán, México. *Biomedica*, 41(Supplement 1 1), 1–28. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5450>.
- Vásquez-Parra, O., García, F. J., Araujo-Reyes, D., & Machado, M. (2015). Dinámica poblacional de *Pteronotus parnellii* y *Anoura geoffroyi* (Mammalia: Chiroptera) en Venezuela. *Ecotrópicos*, 28(July).
- Valverde, E., Cabrero, E., Cao, R., Rodríguez Calvo, M.S., Díaz, A., Barros, F., Alemany, J., Carracedo, A.(1993) Population genetics of three Spanish Populations. *Int. J. Legal Medicine*, 105:251-256.
- Velazco, P. M., & Gardner, A. L. (2009). A new species of *Platyrrhinus* (Chiroptera: Phyllostomidae) from western Colombia and Ecuador, with emended diagnoses of *P. aquilus*, *P. dorsalis*, and *P. umbratus*. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 122(3), 249–281. <https://doi.org/10.2988/08-40.1>
- Velazco, P. M., & Patterson, B. D. (2013). Diversification of the Yellow-shouldered bats, Genus *Sturnira* (Chiroptera, Phyllostomidae), in the New World tropics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68(3), 683–698. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.04.016>
- Velazco, P., & Patterson, B. (2019). Small mammals of the Mayo river basin in northern Peru, with

the description of a new species of *Sturnira* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 429, 1–70.

Velázquez, L. P.A., Md CA, M., & Romero, A. C (2014). Extracción y purificación de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos.

Viana, M., Mancy, R., Biek, R., Cleaveland, S., Cross, P. C., Lloyd-Smith, J. O., & Haydon, D. T. (2014). Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. *Trends in Ecology and Evolution*, 29(5), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.03.002>

Villareal, H., Álvarez, M., Córdoba, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, H., Mendoza, M. Ospina, M., y Umaña, A. M. (2004). Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. Programa de inventarios de Biodiversidad. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.

Villena, F. E., Gomez-puerta, L. A., Jhonston, E. J., Alcazar, O. M. Del, Maguiña, J. L., Albuja, C., Laguna-torres, V. A., Recuenco, S. E., Ballard, S., & Ampuero, J. S. (2018). *First Report of Trypanosoma cruzi Infection in Salivary Gland of Bats from the Peruvian Amazon*. 99(3), 723–728. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0816>

Voigt, C. C., & Kingston, T. (2016). *Bats in the Anthropocene : Conservation of Bats in a Changing World*. London:Springer Open.

Webber, Q.M.R & Willis, C.K.R. (2016) *Sociality, Parasites and Pathogens in Bats*. En *Sociality in bats* eds Ortega J. Springer International Publishing. Switzerland

Wincker, P., Britto, C., Pereira, J.B., Cardoso, M., Oelemann W. & Morel, C. (1994) Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 51(6): 771–777.

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G.,

- Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
- Zúñiga, M. F. (2021). *departamento de Casanare Identificación de Trypanosoma spp . y Leishmania spp . en murciélagos del departamento de Casanare.*
- Zurc, D., & Velazco, P. M. (2010). Análisis morfológico y morfométrico de *Carollia colombiana* Cuartas et al. 2001 y *C. monohernandezii* Muñoz et al. 2004 (Phyllostomidae: Carrollinae) en Colombia. *Chiroptera Neotropical*, 16(1), 567–572. <https://chiroptera.unb.br/index.php/cn/article/view/43/42>
- Zulantay, I., Apt, W., Gil, C. & Rocha, C. (2007) The PCRbased detection or *Trypanosoma cruzi* in the faeces of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic American Trypanosomiasis gives higher sensitivity and a quicker result them routine xenodiagnosis. *Ann Trop Med Parasitol*,101:673-679.

**Apéndices****Anexo A.** Contenido del trabajo de grado

Denaturación	95°C	3 minutos	
Denaturación	94°C	1 minuto	30 ciclos
Anillamiento	<b>52,8°C</b>	1 minuto	
Extensión	72°C	2 minutos	
Extensión final	72°C	10 minutos	

IDENTIFICACIÓN DE TRYPANOSOMA EN MURCIÉLGOS DE SANTANDER 92

**Anexo B.** Identidad de las secuencias obtenidas se realizó con la herramienta BLAST.

Código	Nombre de la especie hospedera	Localdad	Parasito	Total score	Query Cover	E value	porcentaje de identidad	Acceso
Lobr03_LB	<i>Lophostoma brasiliense</i>	Uribe Uribe	<i>Trypanosoma spp</i>	915	100%	0	100.00%	<a href="#">KT368796.1</a>
Arli05_CM	<i>Artibeus lituratus</i>	Graja CICA	<i>Trypanosoma spp</i>	811	100%	0	100.00%	<a href="#">MH411065.1</a>
Arli02_PW	<i>Artibeus lituratus</i>	Campo Duro	<i>Trypanosoma spp</i>	929	100%	0	100.00%	<a href="#">MH319699.1</a>
Arli03_PW	<i>Artibeus lituratus</i>	Campo Duro	<i>Trypanosoma spp</i>	867	100%	0	100.00%	<a href="#">MH319699.1</a>
Urco03_PW	<i>Uroderma convexum</i>	Campo Duro	<i>Trypanosoma spp</i>	1007	100%	0	100.00%	<a href="#">MH319699.1</a>
Momo26_UIS	<i>Molossus molossus</i>	Campus UIS	<i>Trypanosoma spp</i>	739	100%	0	97.47%	<a href="#">MH319699.1</a>
Arpl09_CM	<i>Artibeus planirostris</i>	Granja CICA	<i>Trypanosoma spp</i>	1011	100%	0	100.00%	<a href="#">MH319699.1</a>
Stgi04_CM	<i>Sturnira tildae</i>	Granja CICA	<i>Trypanosoma spp</i>	876	100%	0	100.00%	<a href="#">MH319699.1</a>
Arpl18_SV	<i>Artibeus planirostris</i>	La Colorada	<i>Trypanosoma spp</i>	857	100%	0	98.95%	<a href="#">MH556911.1</a>
Arpl16_SV	<i>Artibeus planirostris</i>	La Colorada	<i>Trypanosoma spp</i>	1009	100%	0	100.00%	<a href="#">MH411062.1</a>
Arpl22_LB	<i>Artibeus planirostris</i>	Uribe Uribe	<i>Trypanosoma spp</i>	963	100%	0	99.81%	<a href="#">MH319699.1</a>
Cape39_PD	<i>Carollia perspicillata</i>	El Roble	<i>Trypanosoma spp</i>	918	100%	0	99.60%	<a href="#">MH319700.1</a>
Ange05_SV	<i>Anoura geoffroyi</i>	La Colorada	<i>Trypanosoma spp</i>	935	100%	0	100.00%	<a href="#">MH319700.1</a>
Cape43_SV	<i>Carollia perspicillata</i>	La Colorada	<i>Trypanosoma spp</i>	946	100%	0	100.00%	<a href="#">MH319700.1</a>
Cape48_LB	<i>Carollia perspicillata</i>	Uribe Uribe	<i>Trypanosoma spp</i>	789	100%	0	99.77%	<a href="#">MH319703.1</a>
Cape42_SV	<i>Carollia perspicillata</i>	La Colorada	<i>Trypanosoma spp</i>	887	100%	0	96.15%	<a href="#">MH319699.1</a>
Momo05_PW	<i>Molossus molossus</i>	Campo Duro	<i>Trypanosoma cruzi</i>	31639	100%	0	99.05%	<a href="#">CP015675.1</a>
Cape14_CM	<i>Carollia perspicillata</i>	Granja CICA	<i>Trypanosoma cruzi</i>	1051	100%	0	99.83%	<a href="#">MK640442.1</a>
Phha01_LB	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Uribe Uribe	<i>Trypanosoma cruzi</i>	981	100%	0	100.00%	<a href="#">MK640442.1</a>
Plal01_SV	<i>Platyrrhinus alberticoi</i>	La Colorada	<i>Trypanosoma cruzi</i>	372	43%	4E-98	97.70%	<a href="#">MF141885.1</a>
Roio03_UIS	<i>Rhogeessa io</i>	Campus UIS	<i>Trypanosoma diosisii</i>	957	100%	0	98.88%	<a href="#">LC326397.1</a>
Stgi19_PD	<i>Sturnira tildae</i>	El Roble	<i>Trypanosoma diosisii</i>	955	100%	0	99.62%	<a href="#">MH411103.1</a>
Stgi29_SV	<i>Sturnira tildae</i>	La Colorada	<i>Trypanosoma diosisii</i>	1038	100%	0	100.00%	<a href="#">MH411103.1</a>
Lobr01_LB	<i>Lophostoma brasiliense</i>	Uribe Uribe	<i>Trypanosoma wauwau</i>	850	100%	0	97.21%	<a href="#">KR653210.1</a>
Lobr02_LB	<i>Lophostoma brasiliense</i>	Uribe Uribe	<i>Trypanosoma wauwau</i>	785	100%	0	97.60%	<a href="#">KR653210.1</a>
Cape28_PD	<i>Carollia perspicillata</i>	El Roble	<i>Rhynchomonas nasuta</i>	821	100%	0	97.14%	<a href="#">AY998642.1</a>