

**Universidad de El Salvador**  
**Facultad de Ciencias Naturales y Matemática**  
**Escuela de Biología**



**“Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en murciélagos de la familia Phyllostomidae, en la finca La Estancia de Malena, cantón Planes de Renderos, San Salvador, El Salvador”.**

**Trabajo de Graduación Presentado por:**

Siliézar Madrid, Kevin Armando      SM14002

Gallegos Grande, Alberto Rafael      GG14039

**Para Optar al Grado de:**

Licenciado en Biología

Ciudad Universitaria, 25 de noviembre de 2022

**Universidad de El Salvador**  
**Facultad de Ciencias Naturales y Matemática**  
**Escuela de Biología**



**“Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en murciélagos de la familia Phyllostomidae, en la finca La Estancia de Malena, cantón Planes de Renderos, San Salvador, El Salvador”.**

**Trabajo de Graduación Presentado por:**

Siliézar Madrid, Kevin Armando      SM14002

Gallegos Grande, Alberto Rafael      GG14039

**Para Optar al Grado de:**

Licenciado en Biología

**Docente asesor:**

Lic. Jairo Galileo Marroquín Elías:

**Asesor externo:**

Lic. Marvin Stanley Rodríguez Aquino:

Ciudad Universitaria, 25 de noviembre de 2022

**Universidad de El Salvador**  
**Facultad de Ciencias Naturales y Matemática**  
**Escuela de Biología**



**“Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en murciélagos de la familia Phyllostomidae, en la finca la Estancia de Malena, cantón Planes de Renderos, San Salvador, El Salvador”.**

**Trabajo de Graduación Presentado por:**

Siliézar Madrid, Kevin Armando      SM14002  
Gallegos Grande, Alberto Rafael      GG14039

**Para Optar al Grado de:**

Licenciado en Biología

**TRIBUNAL CALIFICADOR:**

**Jurado Interno:**

Licda. Angela Gudelia Portillo de Pérez:

**Jurado Externo:**

Dr. Héctor Manuel Ramos Hernández:

Ciudad Universitaria, 25 de noviembre de 2022

## **AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD**

### **Universidad de El Salvador**

#### **Rector**

M.Sc. Roger Armando Arias

#### **Vicerrector Académico**

PhD. Raúl Ernesto Azcúnaga López

#### **Vicerrector Administrativo**

Ing. Juan Rosa Quintanilla

#### **Secretario General**

Ing. Francisco Alarcón

#### **Fiscal**

Lic. Rafael Humberto Peña Marín

### **Facultad de Ciencias Naturales y Matemática**

#### **Decano**

Lic. Mauricio Hernán Lovo Córdova

#### **Vicedecana**

M.Sc. Zoila Virginia Guerrero Mendoza

#### **Secretario**

Lic. Jaime Humberto Salinas Espinoza

#### **Directora Interina Escuela de Biología**

M.Sc. Ana Martha Zetino Calderón

Ciudad Universitaria, 25 de noviembre de 2022

## **DEDICATORIA**

A mi familia por su apoyo incondicional todo este tiempo y a la ciencia

**Kevin.**

A mi madre, por su incondicional amor, por sus sacrificios y esfuerzo.

A mis tíos Margarita de Araujo y Manuel Grande, por su infinito apoyo y ser mis modelos  
a seguir

A mis abuelos Berta Vda. de Gallegos y Rogelio Gallegos (Q.E.P.D) por todo su cariño y  
afecto.

**Rafael.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, mi familia y seres queridos, mis amigos-colegas, y a todas esas personas que me donaron reactivos, me prestaron insumos para capturar murciélagos y me brindaron su apoyo temprano.

Gracias especiales a Stanley Rodríguez por ser mi mentor todo este tiempo y haberme permitido trabajar en su laboratorio, a Michelle Cornejo por ser mi partner in crime y por ser tan buena amiga, a Luis Girón por habernos permitido trabajar en su finca sin cobrarnos, a Raquel Alvarado por su apoyo temprano y a Sofia Rosales por haberme escuchado y darme para las copias.

Y finalmente, gracias especiales a Sci-hub y Lib-gen, por hacer este esfuerzo posible.

**Kevin.**

Al Lic. Stanley Rodríguez por sus enseñanzas y por confiar en mis capacidades, a nuestro asesor el Lic. Jairo Marroquín por ser nuestro guía en este trabajo, al Lic. Luis Girón por sus consejos y apoyo en la fase de campo, a Michelle Cornejo por sus críticas, regaños y más importante su gran corazón y amistad, a todos mis amigos-colegas de campo o laboratorio y familiares con los que he reído durante este viaje y a CENSALUD por toda la ayuda brindada antes y durante este proceso de investigación.

**Rafael.**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	RESUMEN.....	12
2.	INTRODUCCIÓN.....	13
3.	OBJETIVOS.....	15
3.1.	Objetivo general .....	15
3.2.	Objetivos específicos .....	15
4.	MARCO TEÓRICO .....	16
4.1.	Generalidades del Orden Chiroptera.....	16
4.1.1.	Orden Chiroptera .....	16
4.1.2.	Familia Phyllostomidae.....	16
4.1.3.	Familia Desmodontinae.....	17
4.1.4.	Subfamilia Glossophaginae .....	17
4.1.5.	Subfamilia Phyllostominae.....	18
4.1.6.	Subfamilia Carollinae .....	18
4.1.7.	Subfamilia Sternodermatinae .....	19
4.2.	Familia Vespertilionidae .....	20
4.3.	Enfermedad de Chagas. ....	20
4.3.1.	Transmisión y manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas .....	21
4.3.2.	Fase Aguda.....	21
4.3.3.	Fase asintomática. ....	21
4.3.4.	Fase Crónica .....	21
4.3.5.	Tratamiento.....	22
4.3.6.	Diagnóstico. ....	22
4.4.	Enfermedad de Chagas en El Salvador .....	22
4.5.	Tripanosomátidos.....	24
4.6.	Transmisión y distribución epidemiológica de las subpoblaciones de <i>T. cruzi</i> .....	24
4.7.	Detección de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	26
4.8.	Métodos de extracción de sangre .....	26
4.9.	Examen parasitológico.....	27
4.9.1.	Detección por PCR .....	27
4.9.2.	Primers.....	27
5.	ANTECEDENTES .....	28
5.1.	Tripanosomátidos.....	28
5.2.	Chagas en EL Salvador.....	30

5.2.1.	Chagas Agudo.....	30
5.2.2.	Chagas Crónico.....	31
6.	MARCO METODOLÓGICO.....	33
6.1.	Área de Muestreo.....	33
6.1.1.	Sitios de muestreo.....	33
6.2.	Fase de campo.....	34
6.2.1.	Recolección de especímenes.....	34
6.3.	Método de captura.....	34
6.4.	Identificación taxonómica.....	36
6.5.	Toma de muestra.....	36
6.6.	Toma de la Muestra.....	37
6.7.	Fase de Laboratorio.....	39
6.7.1.	Extracción de ADN.....	39
6.8.	Control de calidad.....	40
6.9.	Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR) punto final.....	40
6.9.1.	Materiales y Reactivos.....	40
6.9.2.	Cebadores.....	42
6.9.3.	Elaboración de la Máster Mix.....	42
6.9.4.	Control de calidad.....	43
6.9.5.	Amplificación.....	43
6.10.	Electroforesis.....	43
6.10.1.	Materiales y Reactivos utilizados.....	43
6.11.	Análisis de resultados.....	45
6.12.	Estadística de la Investigación.....	46
7.	RESULTADOS.....	47
7.1.	Especies capturadas.....	47
7.2.	Prevalencia.....	49
8.	DISCUSIÓN.....	53
9.	CONCLUSIONES.....	55
10.	RECOMENDACIONES.....	56
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
12.	ANEXOS.....	65



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Listado de las subpoblaciones (DTU's) y sus respectivos reservorios, vectores y regiones geográficas, junto con sus respectivas manifestaciones clínicas .....	25
<b>Tabla 2:</b> Subfamilias y especies de interés de murciélagos Filostómidos.....	30
<b>Tabla 3.</b> Casos de Chagas agudo.....	30
<b>Tabla 4.</b> Incidencia de Chagas Agudo por 100,000 habitantes .....	31
<b>Tabla 5.</b> Casos de Chagas Crónico, Ministerio de Salud, dirección de epidemiología, unidad de vigilancia de la salud.....	32
<b>Tabla 6.</b> Incidencia de Chagas Crónico por 100,000 ha .....	32
<b>Tabla 7:</b> Sitios de muestreo seleccionados. ....	34
<b>Tabla 8:</b> Secuencias de los primers 121 y 122 Kinetoplastid Minicircle. ....	42
<b>Tabla 9.</b> Abundancia de especies capturadas. ....	47
<b>Tabla 10.</b> Distribución por sexo de murciélagos capturados.....	48
<b>Tabla 11.</b> Estado de los especímenes capturados.....	49
<b>Tabla 12.</b> Sitios de muestreo .....	49
<b>Tabla 13.</b> Prevalencia de <i>T. cruzi</i> en los especímenes capturados .....	50
<b>Tabla 15.</b> Prevalencia de Tripanosomátidos por especie.....	51
<b>Tabla 16.</b> Prevalencia por sitio de muestreo.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Características principales de la familia Phyllostomidae.....	16
<b>Figura 2:</b> Especie representante de la subfamilia Desmodontinae: <i>Desmodus rotundus</i> .....	17
<b>Figura 3:</b> <i>Glossophaga soricina</i> .....	18
<b>Figura 4:</b> Vista lateral de <i>Phyllostomus discolor</i> . .....	18
<b>Figura 5:</b> <i>Carollia perspicillata</i> .....	19
<b>Figura 6:</b> Espécimen del Género <i>Sturnira</i> .....	19
<b>Figura 7:</b> Murciélago rojo Manchado ( <i>Lasiurus borealis</i> ) .....	20
<b>Figura 8.</b> Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en donantes de sangre por departamento de El Salvador.....	23
<b>Figura 9.</b> Relación entre los ciclos selváticos y domésticos de cada subpoblación de <i>T. cruzi</i> respecto.....	26
<b>Figura 10.</b> Distribución de las subpoblaciones de <i>T. c. cruzi</i> (DTU's) detectadas en murciélagos capturados de Suramérica .....	28
<b>Figura 11:</b> Ubicación geográfica del sitio de muestreo y los respectivos puntos de muestreo.....	33
<b>Figura 12:</b> Instalación de las Redes de Neblina .....	35
<b>Figura 13:</b> Desenredo de las redes y transporte de los especímenes .....	35
<b>Figura 14:</b> Identificación Taxonómica de los especímenes capturados.....	36
<b>Figura 15:</b> Hidratación de los especímenes con solución de sacarosa .....	37
<b>Figura 16:</b> Inmovilización del espécimen para punción.....	37
<b>Figura 18:</b> Recuperación y observación post- extracción de sangre.....	38
<b>Figura 19:</b> Extracción de ADN, equipos y materiales usados.....	40
<b>Figura 20:</b> Preparación de la Máster Mix.....	42
<b>Figura 21:</b> Condiciones de PCR en la ventana del termociclador .....	43
<b>Figura 22:</b> Montaje de las muestras en la cámara de electroforesis .....	44
<b>Figura 23:</b> Vista Previa del Software Gel Analyzer. ....	45
<b>Figura 24:</b> Perfiles de Amplificación en Electroforesis .....	46
<b>Figura 25.</b> Frecuencia de las especies capturadas. ....	48
<b>Figura 26.</b> Prevalencia de Tripanosomátidos por especie. ....	51

## INDICE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Hoja de Toma de Datos en Campo. ....	65
<b>Anexo 2.</b> Laboratorio de Campo. ....	65
<b>Anexo 3.</b> Muestras de ADN extraídas. ....	66
<b>Anexo 4.</b> Termociclador Mini Amp, Applied Biosystems™ ....	66
<b>Anexo 5.</b> Gotaq® Green Master Mix ....	67
<b>Anexo 6.</b> Gel Red®, Biotum ....	67
<b>Anexo 7.</b> Fast Gene 50 bp Ladder, Nippon Genetics. ....	68
<b>Anexo 8.</b> Protocolo de Extracción para sangre completa del kit High Pure Template Preparation Marca: Roche .....	68
<b>Anexo 9.</b> Gel de Confirmación para Trypanosoma cruzi y otras especies de Tripanosomátidos.....	69
<b>Anexo 10.</b> Segundo gel de confirmación para Trypanosoma cruzi y otras especies de Tripanosomátidos.....	69

## 1. RESUMEN

Los murciélagos son dispersores altamente exitosos, que ocupan una amplia variedad de nichos ecológicos, estos organismos corresponden a aproximadamente el 20% de los mamíferos conocidos. Los murciélagos influyen la dinámica ecosistémica donde quiera que se encuentren, actuando como polinizadores, dispersores de semillas, y reservorios de virus, hongos y parásitos. Los Tripanosomátidos son un grupo de especies que están distribuidos en todos los continentes, a excepción de la Antártida; infecciones han sido reportadas en primates de África, marsupiales de Australia, y en una amplia variedad de mamíferos terrestres y voladores de América. Actualmente se divide a *T. cruzi* en dos subespecies, en *Trypanosoma cruzi cruzi*, el cual es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas en humanos y en *Trypanosoma cruzi marinkellei*. Se considera que *T. c. cruzi* tiene una estructura poblacional predominantemente clonal, donde la reproducción sexual ocurre raramente entre poblaciones, esto ha dado lugar al surgimiento de siete subpoblaciones claramente distinguibles de *T. c. cruzi*, estas son clasificadas como TcI-TcVI y TcBat, Se emplearon red de neblinas para capturar a los especímenes, luego cada uno de estos fue inmovilizado y se le realizó una pequeña incisión para obtener una muestra de sangre de entre 50-200 uL. El Kit de extracción empleado fue High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche y la master mix empleada fue Gotaq® Green Máster Mix, Marca Promega, así mismo los primers fueron 121 y 122. La prevalencia total observada de Tripanosomátidos fue de un 34.8% (30/86), esta a su vez se subdivide en la prevalencia de total para *T. cruzi* del 30.02% (26/86) y *Trypanosoma spp* del 4.6% (4/86). La presencia de Tripanosomátidos fue observada en 30 especímenes distribuidos en 6 especies y en 2 familias. Los hallazgos de este estudio presentan un patrón similar de prevalencia a la encontrada en otros países de Latinoamérica. No podemos señalar que el porcentaje de infección observado sea el mismo para todo el país, esto debido al número bajo de murciélagos capturados, la poca representatividad de hábitats y la baja riqueza, y aunque era de esperar encontrar al parásito en los quirópteros, no deja de señalar el estudio la alta prevalencia observada y el riesgo potencial que supone para las personas.

## 2. INTRODUCCIÓN

El Salvador es el país que registra el mayor número de casos confirmados de la enfermedad de Chagas para toda la región centroamericana [1], solo en el periodo de 2001-2012, fueron reportados un total de 731 casos agudos para esta enfermedad [2], aunque estas son cifras oficiales del Ministerio de Salud, es difícil hacer estimaciones concretas acerca de la cantidad total de las nuevas infecciones ocurridas para ese mismo periodo de tiempo, esto debido a que la mayoría de infecciones agudas son asintomáticas, solo algunos casos presentan síntomas como fiebre prolongada, malestar, fatiga, edemas en el sitio de inoculación, vomito, etc. siendo signos asociados a otras patologías [3–5]. La mayoría de personas que son portadoras de esta enfermedad nunca llegan a conocer su estado de salud, estos asocian los síntomas a otros tipos de dolencias o enfermedades, y se cree que solo entre el 30-40% de los portadores, desarrollan la fase crónica de la enfermedad [5], donde las manifestaciones clínicas se vuelven más evidentes; en El Salvador los test de Chagas en sangre son mandatorios para todos aquellos individuos que donaran sangre u órganos [6]; para el periodo de 2001 a 2011 fueron examinadas más de 885,000 muestras provenientes de donaciones de sangre, detectando un prevalencia de la enfermedad en 2.5%, esto según datos del banco de sangre del Instituto Salvadoreño del Seguro Social (ISSS), Hospital Militar, Cruz Roja Salvadoreña y Ministerio de Salud de El Salvador (MINSAL) [7].

La transmisión y circulación de *T. cruzi* implica dos ciclos epidemiológicos claramente distinguibles, el ciclo doméstico y el selvático. En el primero, está implicado la trasmisión del parásito a humanos y a animales domésticos, como perros, gatos, roedores etc. [8]; siendo la principal vía de contagio en el país la picadura de *Triatoma dimidiata* (“chinche besucona”). Continuos esfuerzos se han hecho durante décadas para monitorear, controlar y erradicar a poblaciones vectores en toda Centroamérica, y aunque especies como *Rhodnius prolixus* hayan sido exitosamente erradicada de El Salvador según la OPS [9], especies como *T. dimidiata* suponen un riesgo para la salud de cientos de miles de salvadoreños, en condiciones de pobreza confinados a zonas rurales o semirurales. En el ciclo de trasmisión selvático, están interactuando especies de vectores y reservorios (como lo son murciélagos, roedores, marsupiales, etc.) con otros organismos en una red trófica, donde a partir de ciertos eventos estos logran relacionarse con animales y humanos en ambientes peridomiciliares [86].

Los murciélagos son dispersores altamente exitosos, que ocupan una amplia variedad de nichos ecológicos, estos organismos corresponden a aproximadamente el 20% de los mamíferos conocidos. Los murciélagos influyen la dinámica ecosistémica donde quiera que se encuentren, actuando como polinizadores, dispersores de semillas, y reservorios de virus, hongos y parásitos [11]. Se puede definir como reservorio, o más bien a un sistema reservorio, como a la especie o el conjunto de especies, que pueden mantener a un huésped de una forma sostenible, en escala de tiempo indefinida [10]. La ecología de estos animales

realza su relevancia como reservorios de enfermedades infecciosas y patógenos zoonóticos, esto debido a su alta capacidad de desplazamiento, amplia distribución mundial y su estructura social; de entre estos patógenos, destacan la Rabia, SARS, Hantavirus, Ébola y los Tripanosomátidos [12].

Los Tripanosomátidos son protozoarios que pertenecen al orden de los Kinetoplástidos, su principal característica es una altamente inusual, concatenación de la estructura del ADN mitocondrial [13]. Los Tripanosomátidos más comúnmente detectados en el neotrópico son *Trypanosoma cruzi*, *T. dionisii*, *T. rangeli* y *T. conorhini* [14]; *T. cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, y es dividido en dos subespecies *T. c. cruzi* y *T. c. marinkellei* [15]; adicionalmente *T. c. cruzi* es clasificado en siete unidades discretas de tipificación (DTU's) desde TcI a TcVI y TcBat, siendo la última exclusiva de murciélagos [16].

En la actualidad, la investigación científica respecto a la enfermedad de Chagas en El Salvador, se ha enfocado en comprender y monitorear los ciclos de transmisión doméstica de *T. cruzi*, principalmente en humanos y en *T. dimidiata* [17]; poco o nada ha sido hecho para estudiar reservorios naturales del parásito para el país, y aunque no estén directamente relacionados a la transmisión de la enfermedad a humanos, se desconoce cómo pueden estar influenciando los ciclos de transmisión [18].

La siguiente investigación fue realizada en el municipio de San Salvador, cantón Planes de Renderos, en Finca La Estancia de Malena, en el año 2022; la metodología se basó en la captura de especímenes de murciélagos mediante el uso de redes de neblina para su posterior extracción de muestra sanguínea. La fase de laboratorio fue llevada a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo de la Salud (CENSALUD), ubicado en la ciudad universitaria, municipio de San Salvador; estas muestras se les realizó extracción de ADN y para el diagnóstico se utilizaron pruebas moleculares para establecer la prevalencia de *T. cruzi* y otros Tripanosomátidos emparentados.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general:

- Identificar la presencia de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre de murciélagos de la familia Phyllostomidae capturados en la finca “La estancia de Malena”, Cantón Planes de Renderos, San Salvador, a través del uso de pruebas moleculares.

#### 3.2. Objetivos específicos:

- Identificar *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre de murciélagos filostómidos por la reacción en cadena de la polimerasa.
- Identificar las especies de murciélagos de la familia Phyllostomidae asociadas al parásito *Trypanosoma cruzi*
- Determinar las especies de Tripanosomátidos relacionadas a *Trypanosoma cruzi*.

## 4. MARCO TEÓRICO

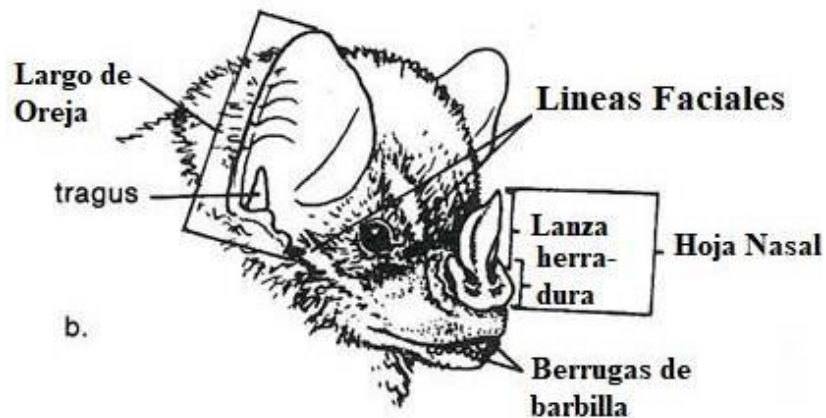
### 4.1. Generalidades del Orden Chiroptera.

#### 4.1.1. Orden Chiroptera.

Comúnmente llamados murciélagos, el orden Chiroptera agrupa aproximadamente a más de 1,100 especies alrededor del mundo, siendo el segundo grupo de mamíferos más diverso después de los Roedores; los murciélagos se dividen en dos subórdenes: Macrochiroptera o murciélagos del viejo mundo que comprenden a murciélagos frugívoros conocidos como “zorros voladores” y Microchiroptera que son el grupo más diversos y con la mayor distribución a nivel mundial, estos además son caracterizados por poseer la capacidad de ecolocalización [19].

#### 4.1.2. Familia Phyllostomidae.

Conocidos como murciélagos con hoja nasal (Figura 1), debido a una estructura en forma de lanza que se extiende sobre las fosas nasales y a una herradura que se envuelve alrededor de la nariz. Los murciélagos filostómidos son el grupo de murciélagos con el mayor rango de hábitos alimenticios, estos pueden ser insectívoros, nectarívoros, frugívoros y hematófagos, estos se distribuyen desde el sur de Estados Unidos, hasta Argentina y se dividen en cinco subfamilias, Desmodontinae, Glossophaginae, Phyllostomidae, Corallinae y Stenodermatinae [20].



**Figura 1:** Características principales de la familia Phyllostomidae [19]



#### 4.1.3. Familia Desmodontinae.

La característica principal de esta subfamilia, es sin duda su dieta ya que son los únicos mamíferos que se alimentan casi exclusivamente de sangre (Hematófagos), siendo las únicas especies representantes: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngii*; aunque las tres especies tienen el potencial de solapar sus fuentes alimenticias, *Diphylla* usualmente se alimenta de aves silvestres, mientras que *Diaemus* se alimenta casi exclusivamente de aves domésticas, por su parte *Desmodus*, es el más generalista del grupo (Figura 2), alimentándose de animales domésticos y salvajes, a su vez, es la especie que reporta el mayor número de ataques a humanos, este último está ampliamente distribuido en Mesoamérica siendo limitados únicamente a tierras bajas debido a que no toleran temperaturas menores a 22 °C; tienen especial interés en salud pública debido a ser agentes transmisores de la enfermedad de la Rabia e otras infecciones por mordeduras [21].



**Figura 2:** Especie representante de la subfamilia Desmodontinae: *Desmodus rotundus*. Fuente: Google imágenes

#### 4.1.4. Subfamilia Glossophaginae.

Son murciélagos pequeños a medianos, su característica principal es su lengua y hocico largo en la gran mayoría (Figura 3), representado por 14 géneros que son: *Anoura*, *Brachyphylla*, *Choeroniscus*, *Choeronycteris*, *Dryadonycteris*, *Erophylla*, *Glossophaga*, *Hylonycteris*, *Leptonycteris*, *Lichonycteris*, *Monophyllus*, *Musonycteris*, *Phyllonycteris* y *Scleronycteris*; se alimentan en su mayoría de néctar, pero dependiendo de las circunstancias también pueden alimentarse de polen, fruta e insectos; Sus refugios son principalmente cuevas, huecos de árboles o estructuras abandonadas que estén cercanas a fuentes de abundante néctar, siendo de gran importancia ecológica y económica debido a su rol de polinizadores [22]



**Figura 3:** *Glossophaga soricina*. Fuente: Carlos Boada 2021 (PUCE).

#### **4.1.5. Subfamilia Phyllostominae.**

Ampliamente distribuidos por todo el continente abarcando distintos ecosistemas y gradientes altitudinales, siendo el segundo grupo más diverso de toda la familia Phyllostomidae, se agrupan en 16 géneros entre estos se encuentran: *Lophostoma*, *Micronycteris*, *Mimon*, *Phyllostomus*, etc. Con 42 especies, además de sus diversos tamaños, su hoja nasal es su característica más notable al ser bien definida (Figura 4), sus hábitos alimenticios varían desde fruta, insectos, néctar o incluso animales pequeños como peces, ranas o lagartijas; pueden ser solitarios o gregarios y sus refugios dependerán de la disponibilidad de su alimento [23]



**Figura 4:** Vista lateral de *Phyllostomus discolor*, destacando su hoja nasal. Fuente: Google Imágenes.

#### **4.1.6. Subfamilia Carollinae.**

Conocidos también como murciélagos de cola corta (Figura 5), siendo esta su principal característica, son murciélagos de tamaño medio que agrupan los géneros *Carollia* y *Rhinophylla*; estos se alimentan de una amplia variedad de frutos principalmente, siendo las espigas de un arbusto del género *Piper* sus preferidas; abarcan una gran variedad de ecosistemas siendo comúnmente catalogados como especies generalistas, estos incluso se adaptan a ambientes urbanos; Una característica especial de las especies que se agrupan esta subfamilia, es el uso de ecolocalización para obtener alimento [24].



**Figura 5:** *Carollia perspicillata*. Fuente: Carlos Niveló PUCE 2021.

#### **4.1.7. Subfamilia Sternodermatinae.**

Es la subfamilia más diversa de la familia Phyllostomidae, agrupando un total de 17 géneros y 59 especies reportados, siendo los géneros *Sturnira*, *Uroderma*, *Artibeus* y *Chiroderma* algunos de sus representantes (Figura 6). Son frugívoros como principal hábito alimenticio pero, también amplían su dieta a insectos, hojas y flores; estos juegan un importante rol ecológico en el neotrópico como dispersores de semillas, ya sea en sus heces o mediante el hábito de llevarse el alimento a sus refugios, los cuales son muy variados y dependerán tanto de la especie como la disponibilidad de alimento; una característica muy singular es que aquí se agrupan los especímenes de mayor tamaño del grupo de los microquirópteros, además de la reducción de la hoja nasal en algunas especies o en el caso de *Centurio senex* la ausencia de esta [25].



**Figura 6:** Especímen del Género *Sturnira*. Fotografía: Michelle Cornejo, CENSALUD.

## 4.2. Familia Vespertilionidae.

Conocidos como “murciélagos nocturnos”, siendo la característica física más notable sus largas colas y orejas enrolladas en algunas especies (Figura 7), este diverso grupo de murciélagos se agrupan en 48 géneros y 402 especies conocidas alrededor del planeta, exceptuando zonas muy frías, su mayor riqueza de especies se encuentran en los trópicos; se alimentan principalmente de insectos, siendo depredadores voraces. Estos cumplen un importante rol ecológico como controladores de poblaciones, exceptuando a miembros del género *Myotis* que son carnívoros; su tamaño es pequeño comparado con otros grupos, pero presentan claro dimorfismo sexual y suelen refugiarse en casi cualquier lugar que les de oscuridad y les permita guardar calor, como cuevas o estructuras antropogénicas [26]



**Figura 7:** Murciélago rojo Manchado (*Lasiurus borealis*), presentando las características propias de la familia Vespertilionidae. Fuente: Karen Powers (ADW).

## 4.3. Enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana, es una enfermedad causada por el agente etiológico *Trypanosoma cruzi*; actualmente se estima que afecta a 8 millones de personas alrededor del mundo, la mayoría en Latinoamérica, causando la muerte de 100,000 personas al año; esta enfermedad ha sido reportada en 21 países de América Latina y se han reportado casos para USA y para algunos países Europeos, esto como consecuencia de las migraciones de personas pertenecientes a países endémicos de la enfermedad [27]. La Organización Mundial de la Salud cataloga a la enfermedad de Chagas, como una de las 17 enfermedades tropicales más descuidadas, esto se debe principalmente a factores socioeconómicos que afectan a la población, debido a que en muchos países de la región no cuentan con planes de control de la enfermedad o sistemas de vigilancia que permitan determinar potenciales sitios de incidencia [28].

#### **4.3.1. Transmisión y manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas.**

La forma más común de contagio de *T. cruzi* en humanos es por medio de la picadura de insectos hematófagos (triatominos) los cuales pertenecen a la familia Reduviidae, y se les conoce comúnmente como “chinche picuda” o “chinche besucona”; estos triatominos, además, pueden alimentarse de animales domésticos, como gallinas, perros, gatos, roedores, etc. La forma de contagio más común implica que el triatomo pique a las personas, normalmente de noche y luego de succionar sangre, estos defecan en el sitio donde se alimentaron, permitiendo que *T. cruzi*, que se encuentra contenido en sus heces, pueda atravesar la piel y difundirse en el flujo sanguíneo. Otras formas de contagio son las transfusiones de sangre y las donaciones de órganos, además de la transmisión vertical de madre a hijo. Existen tres fases claramente distinguibles en el desarrollo de la enfermedad de Chagas, la fase aguda, asintomática y crónica [29].

#### **4.3.2. Fase Aguda.**

Esta fase comienza entre 4 a 14 días después de la inoculación del parásito, y se puede extender de 2 a 4 meses [1]. Es caracterizada por una alta densidad de parásitos (parasitemia) en la sangre del hospedero, donde la enfermedad permanece prácticamente asintomática en un 95% de los pacientes; las manifestaciones clínicas más comunes de esta fase incluyen síntomas no específicos como fiebre, dolor de cabeza, rash, vómito, pérdida de peso y diarrea, pero estos síntomas se alivian con el tiempo y los pacientes normalmente los confunden con otras patologías, además de estos síntomas también pueden presentarse anemia, linfadenopatía, leucocitosis, trombocitopenia y chagoma [8].

#### **4.3.3. Fase asintomática.**

Esta fase es caracterizada por un declive progresivo de la parasitemia en sangre, donde el paciente muestra pruebas serológicas positivas a la enfermedad y carece de síntomas, esta fase comienza unos meses después de la infección parasitaria y puede durar desde meses hasta décadas, esto dependiendo del estatus del sistema inmunológico del paciente y de la tasa de replicación de los epimastigotes; se cree actualmente que alrededor del 30% de los pacientes nunca desarrollan la fase crónica y pasan toda su vida en la fase asintomática [5].

#### **4.3.4. Fase Crónica**

Esta se inicia cuando la parasitemia en sangre es muy baja y las pruebas serológicas son positivas. La fase crónica puede ocurrir entre 10 a 30 años después de la infección y entre el 30-40% de los pacientes de Chagas lo desarrollan; es caracterizada por afectaciones cardíacas y/o gastrointestinales como inflamación del estómago, esófago, colon etc., además también ha sido observado daños al sistema nervioso periférico; la mayoría de pacientes que desconocen que padecen esta enfermedad, asocian estas patologías a problemas relacionados a la vejez [30].

#### **4.3.5. Tratamiento.**

Existen dos drogas que son administradas para tratar la enfermedad de Chagas, estas son el Benznidazol y el Nifurtimox, el primero tiene un promedio de efectividad del 90%, y su uso está aprobado por la FDA para su administración en pacientes de 2 a 12 años; por su parte el Nifurtimox no está aprobado por la FDA, pero se puede obtener bajo protocolos de investigación y tiene un promedio de efectividad del 70%; se ha observado en ambas drogas un aumento en los efectos secundarios respecto a la edad. [31,32].

Para El Salvador, la dosis recomendada por el gobierno respecto a Nifurtimox (tabletas de 120 miligramos) para niños de hasta diez años es de 15-20 mg/kg, adolescentes de once a dieciséis años es de 12.5 -15 mg/kg y mayores de dieciséis años 8-10 mg/kg y como dosis máxima 700 mg en veinticuatro horas. Respecto a Benznidazol (tabletas de 100 miligramos), la dosis en niños es de 5-10 mg/kg y para adultos es de 5-7 mg/kg [33]

#### **4.3.6. Diagnóstico.**

En El Salvador, el diagnóstico de la enfermedad de Chagas debe de basarse en el historial clínico del paciente, si se sospecha que es un caso agudo, se realizan 2 pruebas de confirmación, las cuales son la gota fresca y concentrado de Strout, esto siguiendo el Flujograma de Atención del Paciente Sospecho de Chagas Agudo en el Primer Nivel de Atención. Si se sospecha que el paciente está en fase indeterminado o en estadio crónico con o sin cardiopatía, se realiza un electrocardiograma y pruebas serológicas de ensayo de Inmunoabsorbente, ligado a enzimas (ELISA), ensayo de Hemaglutinación indirecta (IHA) y el ensayo inmunofluorescente indirecto (IFA); todas estas pruebas se basan en la detección de anticuerpos IgG-IgM, si existe discordancia entre las pruebas, se sigue el Flujograma de Atención del Paciente Sospechoso de Chagas Crónico [33,34].

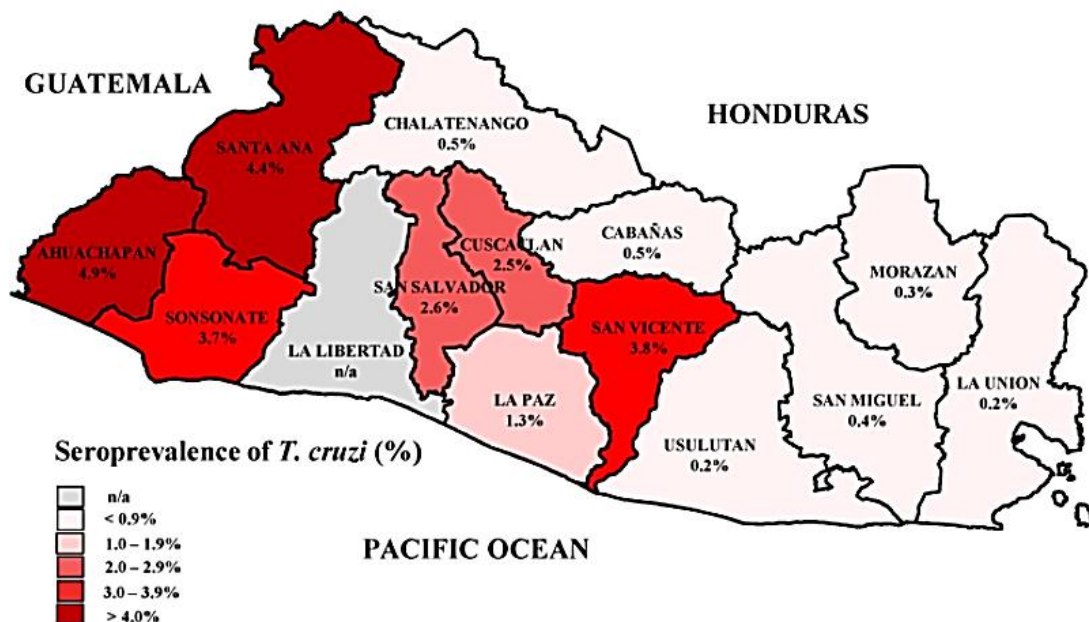
#### **4.4. Enfermedad de Chagas en El Salvador.**

La enfermedad de Chagas ha sido reportada en El Salvador desde 1913 por el Doctor Juan C. Segovia; en 1955 se llevó a cabo un estudio epidemiológico por Luis Peñalver, donde examinaron a más 309 adultos, siendo la seroprevalencia obtenida del 14.2% y en niños menores de 15 años del 19.9%, en otro estudio realizado en 1976 se obtuvo una prevalencia de 24.1% para zona costera y 2.0% para la zona montañosa del país [6]. En 1997 entra la Iniciativa Centroamericana para el Control de la Enfermedad de Chagas (IPCA) con el apoyo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), los cuales promovieron tres objetivos: la eliminación de *Rhodnius prolixus* en América Central, la reducción de la infestación domiciliar de *Triatoma dimidiata* y la eliminación de la transmisión de Chagas por transfusión de sangre y órganos, además esto dio inicio a programas de control de vectores, análisis de donaciones en banco de sangre y campañas de fumigación [35].



Actualmente la única especie vector transmisora de la enfermedad de Chagas reportada en El Salvador es *Triatoma dimidiata*, esta especie es endémica para la región centroamericana y está asociada a ciclos de transmisión doméstica y selvática [36]; *T. dimidiata* tiene una distribución altitudinal desde los 0 a 2400 msnm, esta puede encontrarse predominantemente en hogares hechos con “bahareque” y “adobe” en zonas rurales o semirurales, donde las paredes exhiben rajaduras pronunciadas en las cuales las chinches pueden ocultarse. Hasta hace unas cuantas décadas, *Rhodnius prolixus* jugó un importante rol en la trasmisión de la enfermedad en el país, esta tiene una distribución altitudinal de hasta 800 msnm, pero existen reportes de haber sido encontrado hasta los 1400 msnm; esta especie sólo está implicada en la transmisión doméstica y podía ser encontrada en hogares hechos principalmente de “paja”; a causa de los terremotos del año 2001 muchas casas cuya estructura estaba hecha predominantemente de paja, sufrieron daños irreparables lo que condujo a su abandono y prohibición, en el 2010 se confirmó su eliminación del país [9].

En un estudio comprendido entre 2001-2011, se analizaron aproximadamente más de 885,000 muestras de sangre provenientes 31 bancos de sangre en El Salvador, operados por el Instituto del Seguro Social (ISSS), Hospital Militar y la Cruz Roja (Figura 8), se encontró que más de 21,000 muestras de sangre eran positivas para la enfermedad de Chagas, reportándose una prevalencia promedio del 2.5% para dicho periodo de tiempo. Desde el 2001 al 2011 la seroprevalencia de *T. cruzi* ha disminuido progresivamente del 3.7% al 1.7%, reflejando una reducción del 54% respecto a 2001, siendo los departamentos de occidente los más afectados [7]. Entre el año 2014 al 2017, 771 casos agudos fueron reportados junto con 53 casos crónicos, esto según los últimos datos del Ministerio de Salud, de El Salvador [37].



**Figura 8.** Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en donantes de sangre por departamento de El Salvador [7].

#### 4.5. Tripanosomátidos.

Los Tripanosomátidos son un grupo de especies que están distribuidos en todos los continentes, a excepción de la Antártida; infecciones han sido reportadas en primates de África, marsupiales de Australia, y en una amplia variedad de mamíferos terrestres y voladores de América [38]. La teoría más aceptada para explicar la amplia distribución geográfica de los Tripanosomátidos alrededor del mundo, implica que el clado de *T. cruzi* (el cual está compuesto por más de 18 especies de Tripanosomátidos) surgió de parásitos hospederos de murciélagos hace aproximadamente 70-50 millones de años, los cuales fueron capaces de invadir a especies cercanas a murciélagos en múltiples ocasiones (Bat seeding hypothesis), originando una amplia diversidad de especies de Tripanosomátidos, cada cual asociada a reservorios y vectores distintos [39].

Actualmente se divide a *T. cruzi* en dos subespecies, en *Trypanosoma cruzi cruzi*, el cual es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas en humanos y en *Trypanosoma cruzi marinkellei*, el cual está prácticamente restringido a especies quirópteros y aunque es capaz de infectar a ratones de laboratorio, estos no muestran el mismo nivel de daño histológico que el ocasionado por *T. c. cruzi* [11]. Se considera que *T. c. cruzi* tiene una estructura poblacional predominantemente clonal, donde la reproducción sexual ocurre raramente entre poblaciones [40,41], esto ha dado lugar al surgimiento de siete subpoblaciones claramente distinguibles de *T. c. cruzi*, estas son clasificadas como TcI-TcVI y TcBat, siendo la última exclusiva de murciélagos; aunque se creía previamente que TcBat era incapaz de infectar a humanos, se ha reportado un único caso de infección con TcBat en una niña en Colombia [42].

#### 4.6. Transmisión y distribución epidemiológica de las subpoblaciones de *T. cruzi*.

*Trypanosoma cruzi* es una especie ampliamente generalista, siendo capaz de infectar a cientos de especies de mamíferos distribuidos desde el sur de Estados Unidos, hasta el sur de Argentina [43]. Este parásito es transmitido por docenas de triatomíneos hematófagos, con los cuales el parásito establece infecciones permanentes; respecto a las infecciones en mamíferos, *T. cruzi* establece diferentes patrones de infección con cada huésped, dependiendo de factores como, las subpoblaciones *T. cruzi* presentes, vías de contaminación, estatus nutricional del huésped y otras infecciones parasitarias. La transmisión de *T. cruzi* implica dos ciclos epidemiológicos claramente distinguibles (Figura 9), los ciclos de transmisión selváticos y domésticos (Urbanos). Los ciclos de transmisión selváticos, se definen como la cantidad de tiempo que pasa el parásito circulando entre vectores y reservorios en la naturaleza [10] mientras que los ciclos de transmisión doméstica se refieren a la transmisión del patógeno entre vectores, humanos y reservorios domésticos (perros, gatos, roedores etc.), este último está influenciado por factores sociales, económicos y geográficos propios de la condición de vida de las personas [44].

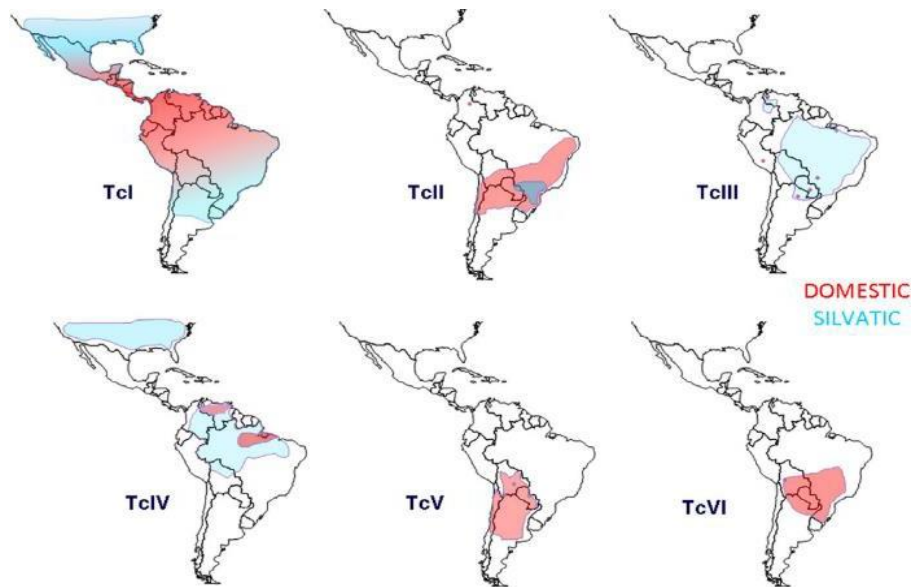
Las subpoblaciones de *T. cruzi* o DTU's están asociadas a diferentes tipos de ciclos de transmisión epidemiológica, esto en relación a vectores, reservorios y a las regiones



geográficas donde estén confinadas, un ejemplo de ello es que la segunda causa de Chagas en Venezuela está relacionada a TcIV, mientras que la trasmisión de TcIII está prácticamente confinada a los ciclos selváticos, donde casos esporádicos en humanos son reportados en el Amazonas [45]; además se ha reportado que cada DTU's está relacionada a ciertas manifestaciones clínicas, pero aún hace falta mucha información al respecto para corroborarlo [46]. En la Tabla 1, se resumen los principales vectores, reservorios y manifestaciones clínicas de cada DTU.

**Tabla 1.** Listado de las subpoblaciones (DTU's) y sus respectivos reservorios, vectores y regiones geográficas, junto con sus respectivas manifestaciones clínicas [45].

<b>DTU</b>	<b>Reservorio selvático.</b>	<b>Vector selvático.</b>	<b>Distribución geográfica.</b>	<b>Patologías asociadas.</b>
TcI	<i>Didelphis</i> , primates, <i>Tamandua</i> , roedores terrestres	Primordialmente <i>Rhodnius</i> , Secundariamente <i>Panstrongylus</i> , <i>Triatoma</i> , <i>Eratyrus</i> ,	Sur, Central y Norte América	Principal causa de Chagas Cardiopatía
TcII	Lista Incompleta. <i>Didelphis</i> , (bosque atlántico) <i>Euphractus</i> (Paraguay)	Lista incompleta: Triatominos	Cono sur, casos esporádicos en el norte	Cardiopatía, inflamación del colón
TcIII	<i>Dasypus</i> , <i>Chaetophractus</i> , <i>Euphractus</i> , <i>Didelphis</i> , <i>Monodelphis</i>	<i>P. geniculatus</i>	América del sur	Raro en humanos (también en perros), manifestaciones clínicas poco descritas
TcIV	Primates, <i>Nasua</i> <i>Nasua</i>	<i>Rhodnius</i> , <i>Panstrongylus</i> , <i>Triatoma</i>	Norte y Sur América	Segunda causa de Chagas en Venezuela.
TcV	Lista incompleta: <i>Dasypus</i> , <i>Euphractus</i> , <i>Octodon</i>	Lista incompleta	Cono del sur, El Gran Chaco, sur extremo de Brasil	Cardiopatía, inflamación del Colon
TcVI	Lista incompleta	Lista incompleta	Cono del sur, El Gran Chaco	Cardiopatía, inflamación del colon



**Figura 9.** Relación entre los ciclos selváticos y domésticos de cada subpoblación de *T. cruzi* respecto a su ubicación geográfica en el continente americano. Las regiones sombreadas de azul representan los sitios donde están ocurriendo infecciones en humanos, mientras que los sitios sombreados de rojo, se refieren a los lugares donde el parásito está confinado a circular entre vectores y reservorios sin infectar a personas [45].

#### 4.7. Detección de *Trypanosoma cruzi*.

Los Tripanosomátidos son parásitos que normalmente se encuentran circulando dentro de la sangre de murciélagos, estos establecen niveles de parasitemia constantes a lo largo de vida del huésped; su detección puede llevarse a cabo por medio de la examinación directa en sangre o por medio de análisis serológicos y moleculares. La examinación microscópica en sangre, es un método laborioso que implica la búsqueda activa del parásito en sangre, mientras que los análisis serológicos, aunque son muy sensitivos en humanos, tienen muchas limitaciones cuando son aplicados a otras especies o mamíferos; por último, las pruebas moleculares son las más sensitivas debido al uso de genes conservados en Tripanosomátidos, pero son más costosas por los equipos y reactivos que se deben utilizar [47]. Todos los análisis implican la toma de sangre de los especímenes.

#### 4.8. Métodos de extracción de sangre.

Las técnicas de recolección de sangre más comunes en murciélagos son la punción cardiaca y la venopunción [48]. La primera técnica consiste en recolectar sangre directamente del corazón a través de una aguja hipodérmica, con este método se pueden extraer hasta 300  $\mu$ L de sangre, esto dependiendo del tamaño del murciélago, pero tiene la consecuencia que los murciélagos no sobreviven el procedimiento y deben de ser sacrificados [49]; mientras que la extracción de sangre por venopunción, implica el sangramiento de los murciélagos por medio de las venas periféricas, donde la sangre es recolectada a través de un tubo capilar con anticoagulante, este es un método menos invasivo, donde los murciélagos son capaces de

recuperarse, pero su principal inconveniente es que se extrae muy poca sangre por ejemplares, en algunos casos hasta menos de 20  $\mu\text{L}$  [50].

#### **4.9. Examen parasitológico.**

Los exámenes parasitológicos se hacen con el propósito de detectar tempranamente a parásitos presentes en sangre, además estos cumplen el objetivo de discriminar entre las muestras que no, lo cual permite bajar costos y ahorrar reactivos al momento de conducir la fase de laboratorio. Una de las principales técnicas para observar parásitos al fresco, consiste en hacer un frotis de sangre en un portaobjetos, esta es luego teñida con Giemsa o Wright, lo cual permite observar las estructuras parasitarias a través del microscopio [51].

Los hemocultivos, son una de las técnicas más usada para detectar Tripanosomátidos, para ello una muestra de sangre es inoculado en un medio de cultivo (Medio LIT o NNN), luego el medio es observado hasta que haya una confirmación del crecimiento parasitario, la principal ventaja de esta técnica es que permite aislar y cultivar especies de interés de Tripanosomátidos, su principal desventaja es que no todas las especies de Tripanosomátidos pueden ser cultivadas, además es una técnica que puede tardar hasta cinco meses en dar resultados positivos [11]. Por último, la técnica de Microhematocrito o Concentrado de Strout, es la técnica más sensible para detectar Tripanosomátidos, esta técnica necesita como mínimo 25  $\mu\text{L}$  de sangre, esta luego es depositados en un tubo capilar, que posteriormente es centrifugado, si existe Tripanosomátidos en las muestras, estos pueden ser aislados y vistos al microscopio para una confirmación visual [52].

##### **4.9.1. Detección por PCR.**

Esta es la técnica más usada en los estudios modernos para detectar y construir árboles filogenéticos acerca de la diversidad de especies de Tripanosomátidos, así como su variabilidad genética; aunque esta técnica es altamente sensible, no es aplicada al diagnóstico convencional porque es cara y requiere de equipos sofisticados. Numerosas metodologías han sido propuestas para detectar y clasificar Tripanosomátidos con el uso de PCR convencional, Nested PCR y qPCR, cada cual con sus ventajas y desventajas [53–55].

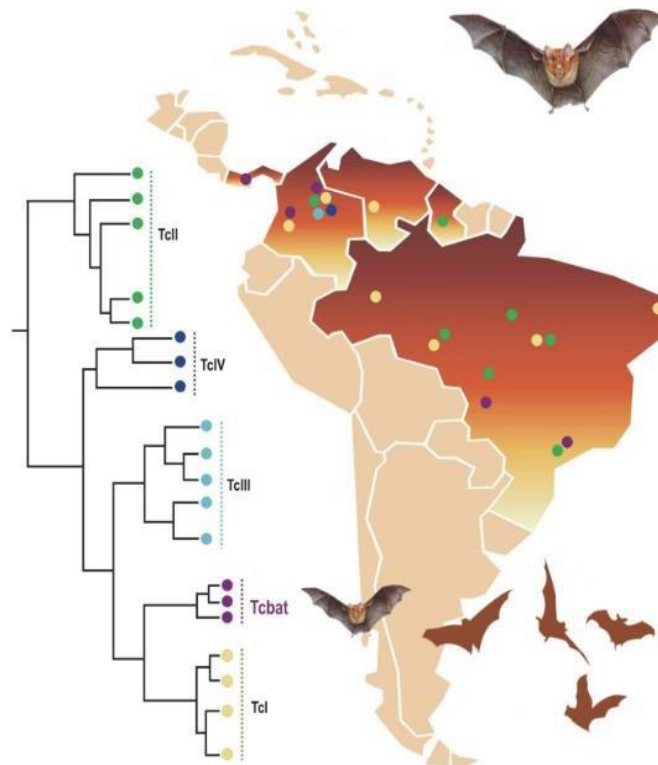
##### **4.9.2. Primers.**

Los primers (o cebadores) más usados para diagnosticar *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre son TcZ1 y TcZ2 [56,57] y 121 y 122 [46]; el primer set es más sensible y exclusivo para detectar a *T. cruzi*, estos generan una banda de amplificación de 188 pb, mientras que los primers 121 y 122 son capaces de detectar a otras especies de Tripanosomátidos como *T. c. marinkellei*, *T. rangeli* y *T. dionisii* y de diferenciarlos de acuerdo al tamaño de la banda amplificada [13].

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1. Tripanosomátidos.

Un reservorio o más bien un sistema de reservorio, es definido como la especie o el conjunto de especies que permiten el mantenimiento del patógeno en la naturaleza de una forma sostenible en un periodo indeterminado de tiempo. Los murciélagos son el principal reservorio de Tripanosomátidos en la naturaleza, estos son incluso considerados bioacumuladores de Tripanosomátidos [10,13]. Los murciélagos corresponden a aproximadamente el 20% de las especies de mamíferos conocidos, estos son importantes componentes de las comunidades tropicales, debido a que ocupan una amplia variedad de nichos ecológicos [19]. La ecología de estos mamíferos, resalta su relevancia como reservorio debido a su gran capacidad de desplazamiento, amplia distribución geográfica y comportamiento social; en el pasado se ha ligado a los murciélagos con el surgimiento y dispersión de enfermedades emergentes como Rabia, SARS, Hantavirus, Ébola y Tripanosomátidos [58,59]. Las especies de Tripanosomátidos más comúnmente detectados en los trópicos son *T. c. cruzi*, *T. c. marinkellei*, *T. rangeli*, *T. dionisii* y *T. conorhini* [14] Además de diferentes tipos de subpoblaciones (TcI a TcVI) de *T. c. cruzi* han sido observadas circulando en murciélagos. En la figura 10, se puede observar la distribución de las subpoblaciones de *T. c. cruzi* detectados en murciélagos en Suramérica.



**Figura 10.** Distribución de las subpoblaciones de *T. c. cruzi* (DTU's) detectadas en murciélagos capturados de Suramérica [60].

Las infecciones con Tripanosomátidos, interacciones ecológicas y sus implicaciones epidemiológicas respecto a los murciélagos representan una línea de investigación muy activa en la última década. En Panamá en 2012, como parte de un estudio de parásitos asociados a murciélagos, fue observada una prevalencia del 11.6% de *T. c. cruzi* en muestras de sangre de *Artibeus jamaicensis*, todas las muestras pertenecieron a TcBat [61], para el mismo año en Bolivia, fue conducido un estudio en más de 90 especímenes de *Carollia perspicillata*, y fue logrado detectar y aislar de su sangre muestras de *T. c. marinkellei* y *T. dionisii* [13]. En el 2014 un estudio en Perú, analizó la prevalencia de *Trypanosoma spp* y *T. cruzi* en más 121 murciélagos, la mayoría pertenecientes a la familia Phyllostomidae, los investigadores observaron una prevalencia del 34.7 y 5% respectivamente [51].

En un estudio conducido en Colombia en el 2014, examinaron un total de 175 especímenes de murciélagos, en su mayoría de la familia Phyllostomidae, los investigadores encontraron que 107 (61%) especímenes presentaban infecciones positivas para Tripanosomátidos; las prevalencias respectivas fueron de *T. cruzi cruzi* (51%), *T. c. marinkellei* (9%), *T. dionisii* (13%), *T. rangeli* (21%), *T. evansi* (4%) and *T. theileri* (2%), mientras que las subpoblaciones de *T. c. cruzi* fueron TcI (60%), TcII (15%), TcIII (7%), TcIV (7%) and TcBat (11%) [62].

Respecto a Brasil, diversos estudios han sido hechos enfocados en la distribución y diversidad genética de especies de Tripanosomátidos. En 2017, en la región del bosque atlántico del estado de Espírito Santo, fueron capturados más de 90 especímenes de murciélagos, de los cuales, 34 especímenes (37%) dieron un resultado positivo para la presencia de Tripanosomátidos, siendo que la mayoría de las muestras tenían infecciones mixtas de diferentes DTU's [63].

Un año más tarde, en la selva amazónica del estado de Acre Brasil, fueron capturados 367 murciélagos, pertenecientes a tres familias (Phyllostomidae, Emballonuridae y Vespertilionidae); de estos 81 murciélagos (22%) presentaron hemocultivos positivos de Tripanosomátidos, las Subpoblaciones encontradas de *T. c. cruzi* fueron TcI, TcIV, TcV; además de especies como *T. rangeli* y *T. dionisii* [47]. Para el mismo año, en los bosques de galería de la sabana tropical brasileña (Estado Federal de Brasil), fueron capturados y analizados más de 146 especímenes de murciélagos, de los cuales 111 (76%) mostraron resultados positivos para la presencia de Tripanosomátidos por qPCR, de estas 66 muestras fueron positivas para la presencia de *T. dionisii* y 17 muestras fueron positivas para coinfecciones con *T. dionisii* y *Leishmania spp* [64].

En la actualidad se siguen encontrando y descubriendo nuevas especies de Tripanosomátidos asociados a murciélagos, como es el caso de *T. wuawua* del cual se tiene poca información y escasos reportes en Brasil [18] y *Trypanosoma madeirae* la cual es una nueva especie descrita de Tripanosomátidos asociados a *Desmodus rotundus* “murciélago vampiro” [52].

Basados en estudios realizados en quirópteros desde 2004 hasta 2018 en el país [65–67], la familia Phyllostomidae es la más abundante y diversa de El Salvador; en la tabla 2 se detallan

Subfamilias y especies de filostómidos reportados como infectados con Tripanosomátidos en Sudamérica

**Tabla 2:** Subfamilias y especies de interés de murciélagos Filostómidos que están presentes en El Salvador y que tienen reportes de estar infectados con Tripanosomátidos y *Trypanosoma cruzi* según estudios epidemiológicos realizados en Sur América

Subfamilia	Género	Especie	Referencia de infección con Tripanosomátidos.
Desmodontinae	<i>Desmodus</i>	<i>rotundus</i>	[11,15,51,62]
Glossophaginae	<i>Glossophaga</i>	<i>soricina</i>	[10,11,15,68]
Phyllostominae	<i>Phyllostomus</i>	<i>discolor</i>	[11,13,47,63]
Carollinae	<i>Carollia</i>	<i>perspicillata</i>	[10,11,13,62,63,68]
Stenodermatinae	<i>Artibeus</i>	<i>jamaicensis</i>	[61]
		<i>lituratus</i>	[47,51,68]

## 5.2. Chagas en EL Salvador.

### 5.2.1. Chagas Agudo.

A nivel nacional, se reportaron entre 2012- 2022, en promedio por año, 8 casos confirmados de Chagas Agudo a nivel nacional (Tabla 3), la incidencia promedio en este periodo fue del 0.13% por cada 100,000 habitantes, siendo el año 2013 con el mayor número de casos reportados a nivel nacional (Tabla 4), 21 casos confirmados con una incidencia del 0.33% y el año con menos casos confirmados fue el 2018 con 4 casos confirmados y una incidencia del 0.04%. (VIGEPES 2022).

**Tabla 3.** Casos de Chagas agudo (VIGEPES 2022).

Chagas agudo por año					
Año	Sospechoso	Positivo	Negativos	Otros	Total
2012	58	16	42	1	75
2013	39	21	18	0	60
2014	34	16	18	0	50
2015	78	12	66	0	90

2016	42	10	32	0	52
2017	25	9	16	0	34
2018	59	3	56	0	62
2019	56	8	48	0	64
2020	21	0	21	0	21
2021	37	0	37	0	37

**Nota:** Desde el 2020 no se reportan nuevos casos agudos de Chagas, esto se desconoce si es debido a una nueva metodología de trabajo en el sistema de vigilancia o por la pandemia de Covid-19.

**Tabla 4.** Incidencia de Chagas Agudo por 100,000 habitantes (VIGEPES 2022).

<b>Incidencia de Chagas Agudo por 100,000 ha</b>			
Año	Positivos	Habitantes	Incidencia (%)
2012	16	6,238,000	0.26
2013	21	6,266,000	0.34
2014	16	6,295,000	0.25
2015	12	6,325,000	0.19
2016	10	6,356,000	0.16
2017	9	6,388,000	0.14
2018	3	6,421,000	0.05
2019	8	6,451,000	0.12
2020	0	0	0.00
2021	0	0	0.00
2022*	0	0	0.00
Promedio	8.6		0.14

### 5.2.2. Chagas Crónico.

A nivel nacional, el promedio de casos confirmados de Chagas Crónico fue de 195 casos reportados en el periodo del 2012 al 2022 (Tabla 5), siendo la incidencia promedio del 3% por cada 100,000 habitantes; el año 2012 tuvo el mayor número de casos confirmados, 185 casos confirmados con una incidencia del 12%, por su parte el 2019 conto con solo 2 casos reportados a nivel nacional (Tabla 6).

Los casos a nivel nacional de Chagas Agudo y Crónico reportados llegan hasta el año 2019 debido a la pandemia de COVID-19, que a inicios del 2020 fue el inicio de los periodos de cuarentena y todos los recursos destinados a Salud eran utilizados para combatir la pandemia. Los casos agudos se reportan de hospitales en su mayoría mediante concentrado de Strout o gota fresca como protocolo en pacientes febriles y los casos crónicos en su mayoría se reportan en bancos de sangre a través de prueba ELISA, estos entran al sistema de vigilancia

epidemiológica y son remitidos al Laboratorio nacional de referencia para confirmar el diagnóstico.

**Tabla 5.** Casos de Chagas Crónico, Ministerio de Salud, dirección de epidemiología, unidad de vigilancia de la salud (VIGEPES 2022).

<b>Chagas crónico por año</b>					
Año	Sospechoso	Positivo	Negativos	Otros	Total
2012	728	185	2	5	920*
2013	325	140	0	0	465
2014	322	145	0	4	471
2015	561	377	0	1	939
2016	600	353	0	0	953
2017	566	403	0	2	971
2018	1036	16	0	0	1052
2019	717	2	0	0	719
2020	313	0	0	0	313
2021	463	0	0	0	463
2022*	296	0	0	0	296

**Tabla 6.** Incidencia de Chagas Crónico por 100,000 ha. Ministerio de Salud, dirección de epidemiología, unidad de vigilancia de la salud (VIGEPES 2022).

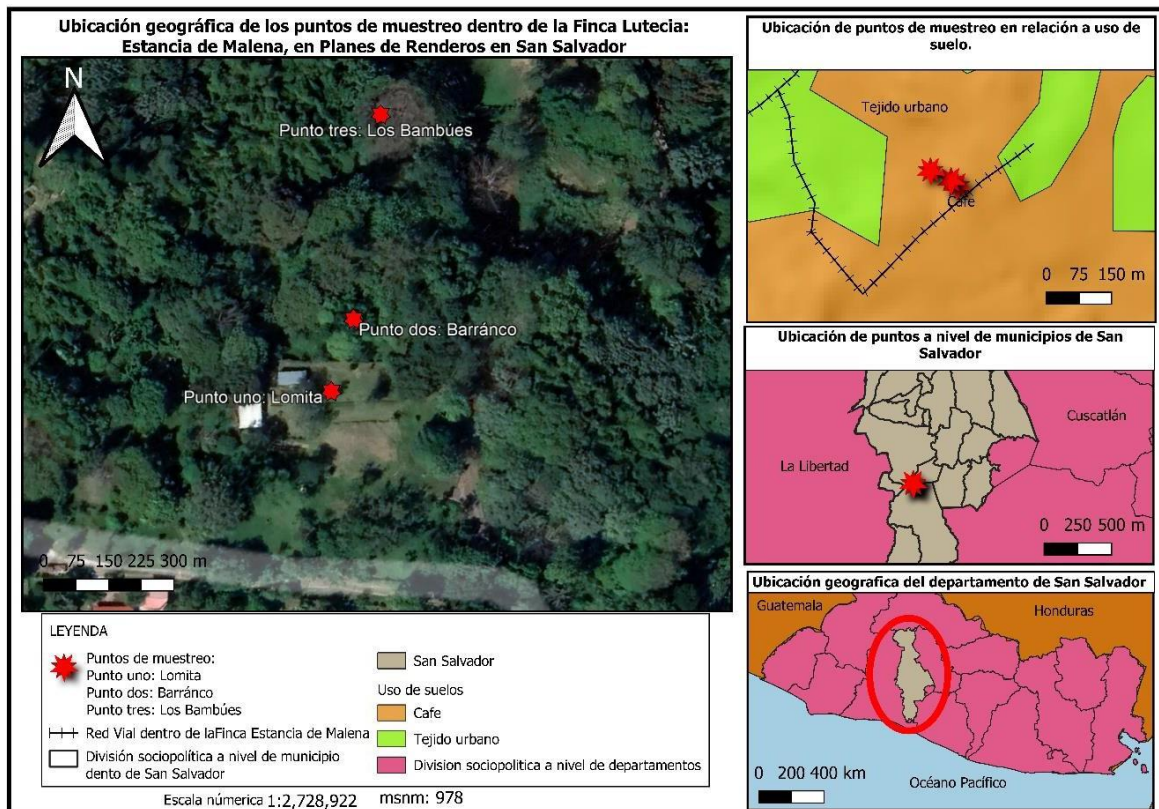
<b>Incidencia de Chagas Crónico por cada 100,000 ha</b>			
Año	Positivos	Habitantes	Incidencia (%)
2012	728	6,238,000	12
2013	140	6,266,000	2
2014	145	6,295,000	2
2015	377	6,325,000	6
2016	353	6,356,000	6
2017	403	6,388,000	6
2018	16	6,421,000	0
2019	2	6,451,000	0
2020	0	0	0
2021	0	0	0
2022	0	0	0
Promedio	196.7		3



## 6. MARCO METODOLÓGICO

### 6.1. Área de Muestreo.

La Finca “La Estancia de Malena” está ubicada en el kilómetro 9 de la carretera a Los Planes de Renderos, municipio de San Salvador, Departamento de San Salvador (Figura 11). La finca actualmente se compone de un conjunto de parcelas o terrenos privados, siendo en un inicio un sistema agroforestal de Naranja de Sevilla o Naranja Agria (*Citrus x aurantium*) asociado a un bosque de Pino-Ciprés.



**Figura 11:** Ubicación geográfica del sitio de muestreo y los respectivos puntos de muestreo. Elaborado por: Lic. Guillermo Recinos.

#### 6.1.1. Sitios de muestreo.

Se escogieron tres sitios de muestreos dentro de la finca, estos a su vez cumplieron con ciertas características claves para su elección, basados en información proporcionada por miembros del Programa de Conservación de Murciélagos de El Salvador (PCMES); para establecer en ellos las redes de neblina para la captura. (Tabla 7).

**Tabla 7:** Sitios de muestreo seleccionados.

<b>Nombre</b>	<b>Característica</b>	<b>Coordenadas</b>
Sitio 1: Lomita	Abundancia de árboles frutales, sitios de percha e insectos por cercanía a estructuras antropogénicas.	13°38'34.04" Norte y 89°11'44.64" Oeste
Sitio 2: Barranco	Abundancia de árboles frutales y con inflorescencias, un gran espacio abierto para vuelo y circulación.	13°38'34.44" Norte y 89°11'45.10" Oeste
Sitio 3: Bambúes	Cercanía al cuerpo de agua, espacio para circulación y conexión con el área más densa de vegetación.	13°38'35.16" Norte y 89°11'46.68" Oeste

## **6.2. Fase de campo.**

La fase de campo se dividió en dos etapas, la primera consistió en la captura e identificación taxonómica de especímenes, y la segunda en la extracción de muestra de sangre; para ambas etapas se necesitó de metodología, materiales y equipos diferentes.

### **6.2.1. Recolección de especímenes.**

#### **Materiales y equipos utilizados.**

- Redes de neblina de 6 x 2.5.
- Parales de PVC de 1.5 metros.
- Guantes de jardinería.
- Cuerda de poliestireno de 10 metros.
- Bolsas de tela de algodón.
- Lámparas de cabeza.
- Navaja pequeña.
- Pie de rey.
- Balanza pequeña.
- Pinza pequeña.
- Lupa.
- Hoja de datos y lápiz.
- Guías de identificación.

### **6.3. Método de captura.**

Los muestreos se realizaron en el mes de mayo y junio durante las fases lunares de cuarto menguante y luna llena del año 2022, esto para asegurar la eficiencia máxima del esfuerzo de captura; realizándose un total de 4 muestreos, incluyendo 2 muestreos de reconocimiento, siendo el método un muestreo aleatorio simple.

La captura en campo se realizó mediante una organización logística y exhaustiva narrada en los siguientes pasos:

- 1- Se utilizaron un total de 4 redes de neblina de 6 x 2.5, dos sencillas en el sitio 1 y 3 de 6 metros de largo y una doble de 12 metros de largo para el sitio 2, debido a sus características previamente mencionadas. La instalación (Figura 12) inició a las 5:00 pm y estas fueron abiertas a las 6:00 pm, siendo revisadas en periodos comprendidos de 30 a 45 minutos dependiendo de la frecuencia de captura, finalizando a las 12:00 am.



**Figura 12:** Instalación de las Redes de Neblina.

- 2- Una vez confirmada la captura, se procedió a desenredar cuidadosamente los especímenes de las redes evitando que padezcan estrés durante el proceso (Figura 13). Una vez liberados los murciélagos se depositaron en bolsas de algodón para ser trasladados al laboratorio de campo para su identificación y extracción de muestra de sangre.



**Figura 13:** Desenredo de las redes y transporte de los especímenes.



#### 6.4. Identificación taxonómica.

Finalizaba cada ronda de inspección de redes, se procedió a verificar el estado, sexo y peso, de cada uno de los especímenes, exceptuando a las hembras lactantes, debido a que no fueron de interés por el estrés al cual serían sometidas durante la etapa de extracción de muestra de sangre.

Mediante el uso de herramientas sencillas y observación de sus características morfológicas externas (Figura 14), se procedió a pasar clave taxonómica [69–71], a cada espécimen, para determinar subfamilia, género y especie a cuál pertenecían; cuando existieron discrepancias en cuanto la identificación, fue comunicado al Lic. Luis Girón, miembro del PCMES y experto en el área de ecología y diversidad de Quirópteros en El Salvador, para confirmar su identificación.



**Figura 14:** Identificación Taxonómica de los especímenes capturados.

#### 6.5. Toma de muestra.

##### Materiales y Reactivos Utilizados.

- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL.
- Micropipeta de 50-100  $\mu$ L.
- Puntas de 100  $\mu$ L.
- Jeringa de 1.0 mL.
- Jeringas de 3.0 mL
- Guantes de nitrilo talla S y M.
- Guantes de jardinería.
- Hielera pequeña.
- Pingüinos congelados.
- Algodón
- Papel absorbente
- Rack
- Descarte para bioinfecciosos.
- Bolsa ziploc para bioinfecciosos
- Etanol 70% y 90%
- Papel toalla
- Solución de sacarosa.
- Solución de 6 M de Guanidina-HCl y 0.2 M EDTA.
- Esmalte de uñas.
- Marcador punta fina.
- Etiquetas.

## 6.6. Toma de la Muestra.

Previa a la extracción de la muestra, se evaluó una vez más el estado del espécimen, para constatar que no tuviere alguna lesión cutánea o se encontrase deshidratado; junto a esto se corroboró que el espécimen no tuviera una marca realizada con esmalte de algún muestreo anterior y así evitar sesgo. A continuación, se preparó al individuo para la extracción, siguiendo esta serie de pasos:

- 1- Se proporcionó a cada individuo una dosis de solución de sacarosa previa a iniciar la punción (Figura 15), por si el espécimen no había ingerido alimento o se encontraba deshidratado para así aumentar las probabilidades de supervivencia del espécimen.



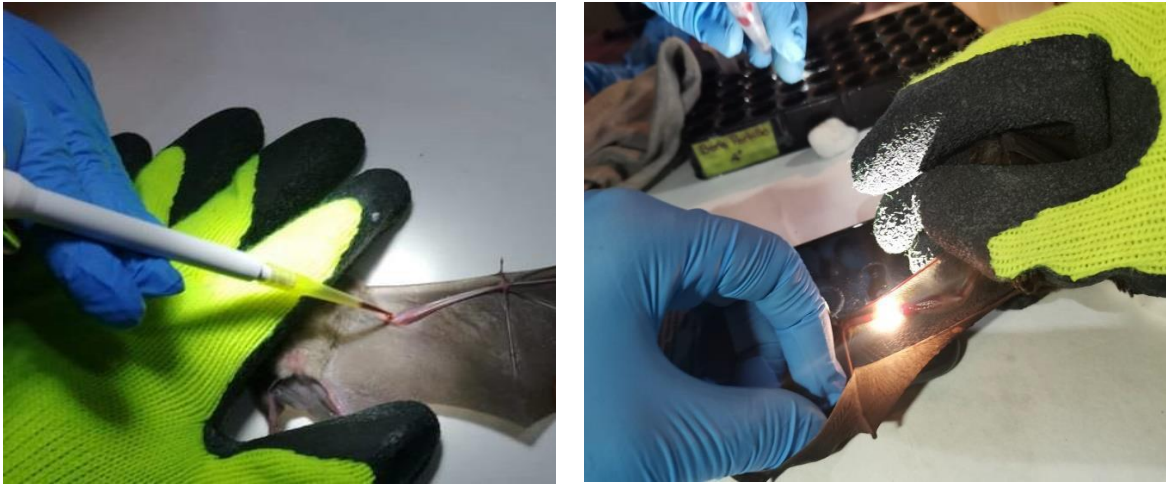
**Figura 15:** Hidratación de los especímenes con solución de sacarosa.

- 2- Después se colocaron sobre la mesa de trabajo papel absorbente y se procedió a inmovilizar el espécimen colocándolo en posición ventral y apoyando suave pero firmemente la mano sobre él, sosteniendo la cabeza entre el dedo anular y medio y extendiendo el ala con el dedo índice y pulgar (Figura 16).



**Figura 16:** Inmovilización del espécimen para punción.

- 3- Mientras un tesista lo inmovilizo, el otro esteriliza en antebrazo con un algodón y etanol al 90% y tomando una jeringa de 1 mL en un ángulo de 45 grados, c (Figura 17).



. **Figura 17:** Extracción y recolección de sangre

- 4- La sangre colectada se trasladó a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con 200  $\mu$ L de Solución de Guanidina-HCl a 6 M y 2 M de EDTA, los tubos fueron guardados y transportados en una hielera a refrigeración por  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta ser procesados en el laboratorio.
- 5- Una vez finalizado el proceso, al espécimen se le cerraba su herida con algodón seco y se le daba una vez más solución de sacarosa hasta quedar satisfecho, por último, se les colocaba una marca circular en el patagio próximo a la axila con esmalte de uña; se los dejaba reposar, observando en todo momento su estado y una vez asegurado su recuperación, se les dejaba perchado en un lugar cercano o eran liberados directamente liberados (Figura 18).



**Figura 18:** Recuperación y observación post- extracción de sangre.

Al finalizar el proceso de toma de muestra, todos los desechos bioinfecciosos fueron descartados siguiendo las normas para manipular desechos bioinfecciosos y se limpió el área usando papel toalla y etanol al 70%; además, durante los muestreos, ningún espécimen murió ya sea durante la fase de captura o extracción de la muestra.

### **6.7. Fase de Laboratorio.**

Todos los procesos, materiales y equipos utilizados durante la fase de laboratorio fueron realizados y proporcionados por el Centro de Investigación y Desarrollo en la Salud (CENSALUD), ubicado en la Universidad de El Salvador, bajo la autorización y coordinación del Lic. Marvin Stanley Rodríguez, jefe del Área de Biología Molecular y asesor externo.

Durante la Fase de laboratorio, la metodología empleada se separó en 3 fases diferentes para realizar el diagnóstico de *T. cruzi* en las muestras obtenidas siendo: extracción de ADN, PCR punto final y electroforesis.

Los equipos electrónicos utilizados durante la fase de laboratorio fueron:

- Termociclador.
- Microcentrífuga.
- Vortex.
- Hotplate de 24 pozos.
- Cámara de flujo laminar.
- Cámara de electroforesis.
- Balanza analítica.
- Regulador de voltaje.
- Refrigerador a -20°C.
- Transiluminador UV.
- Espectrofotómetro.
- Microondas.
- Laptop.

#### **6.7.1. Extracción de ADN.**

##### **Materiales y Reactivos utilizados**

- Micropipeta de 10, 200 y 1000  $\mu$ L.
- Puntas con filtro de 10, 200 y 1000  $\mu$ L.
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL.
- Rack para tubos.
- Guantes de nitrilo talla M.
- Papel Toalla.
- Beaker de 350 mL.
- Probeta de 100 mL.
- Etanol 70%.
- Etanol absoluto.
- Proteinasa K.
- Solución Guanidina-HCl 6 M y 2 M EDTA.
- Sangre completa humana.
- Agua ultrapura.
- Descarte de desechos bioinfecciosos.
- Kit de extracción.
- Cuaderno de laboratorio.
- Lapicero y marcador punta fina.



Previa a la extracción de ADN, las muestras fueron evaluadas para verificar su estado para luego, ser sometidas a un spin a máxima velocidad en centrifuga por 10 segundos, esto para aprovechar la muestra contenida en las paredes del tubo.

El protocolo establecido (Ver Anexo 8), es el recomendado por el fabricante del kit High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche, sin ninguna modificación, siguiendo estrictas normas de bioseguridad establecidas por CENSALUD (Figura 19). A continuación, se detallan el contenido del Kit de extracción:

- 1- Columnas de spin.
- 2- Tubos colectores.
- 3- Binding buffer.
- 4- Inhibitor removal buffer.
- 5- Wash buffer.
- 6- Elution buffer.



**Figura 19:** Extracción de ADN, equipos y materiales usados.

### **6.8. Control de calidad.**

Finalizada la extracción de las muestras, estas fueron llevadas a un espectrofotómetro marca Jenway para su cuantificación, dejando como estándar mínimo de concentración de ADN de  $10 \mu\text{g/mL}$  y valores de absorbancia de  $A_{260/280} = 1.7 \sim 2.0$  y  $A_{260/230} = 1.9 \sim 2.2$ .

Se realizaron un total de 4 extracciones, divididas en grupos de 20, durante cada extracción se llevaban 2 controles de calidad: Control de extracción con sangre humana completa y control negativo con agua ultrapura. Estos controles fueron cuantificados y sometidos a PCR durante los ensayos para comprobar que efectivamente no hubo contaminación cruzada durante el proceso de extracción.



## 6.9. Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR) punto final.

### 6.9.1. Materiales y Reactivos.

- Micropipetas de 10, 100 y 200 µL.
- Puntas con filtro de 10, 100 y 200 µL.
- Tubos para PCR.
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL.
- Beaker de 200 mL.
- Rack para tubos de PCR.
- Papel toalla.
- Bandeja.
- Marcador punta fina.
- Cuaderno de laboratorio y lapicero.
- Hielo triturado.
- Guantes de nitrilo talla M.
- Etanol 70%.
- Agua ultrapura.
- Gotaq® Green Máster Mix.
- Primers 121 y 122.

Para la etapa de amplificación, como parte de los procesos estandarizados por CENSALUD, todo el proceso se realizó en cámara de flujo laminar previamente preparada y esterilizada para su uso, además de asegurar todas las medidas de bioseguridad y cadena en frío.

### 6.9.2. Cebadores.

Los cebadores (Primers) seleccionados para la investigación fueron: 121 y 122 Minicircle, cuyas secuencias son mostradas en la tabla 8. Estos Primers fueron seleccionados mediante una exhaustiva revisión bibliográfica, siendo reportados como primers específicos para la detección por *Trypanosoma cruzi cruzi* según Ramirez y colaboradores en 2014, obteniendo un amplicón de 330 bp, para *Trypanosoma rangeli* amplifica entre 350 y 380 bp, según Botero y colaboradores en 2010, para *T. cruzi marinkellei* entre 250-350 bp según Hernández y colaboradores en 2016 y *T. dionisii* 600 bp según García y colaboradores en 2012.

**Tabla 8:** Secuencias de los primers 121 y 122 Kinetoplastid Minicircle.

Cebador	Secuencia
Primer “121” Minicircle	5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3'
Primer “122” Minicircle	5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'

### 6.9.3. Elaboración de la Máster Mix.

El proceso de elaboración de máster mix, se empleó una mezcla comercial Gotaq® Green Máster Mix, Marca Promega (Ver Anexo 5), que contiene: Taq DNA Polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y otros buffers. Los pasos para elaborar la máster Mix fueron los siguientes:

En una bandeja con hielo triturado, se colocaron los reactivos y las muestras para ser transportados y utilizados en la cámara de flujo laminar; un tubo de microcentrífuga 1.5 mL, se colocó 12.5 µL de Gotaq® Green Máster Mix, 2.5 µL de cebadores y 5.0 µL de agua ultrapura para obtener un volumen final de 20 µL por muestra. Este volumen se trasladó y dividió control en tubos de PCR, para luego dispensar 5 µL de muestra de ADN extraído, mezclando bien y sellando firmemente los tubos, obteniendo un volumen final de 25 µL (Figura 20).

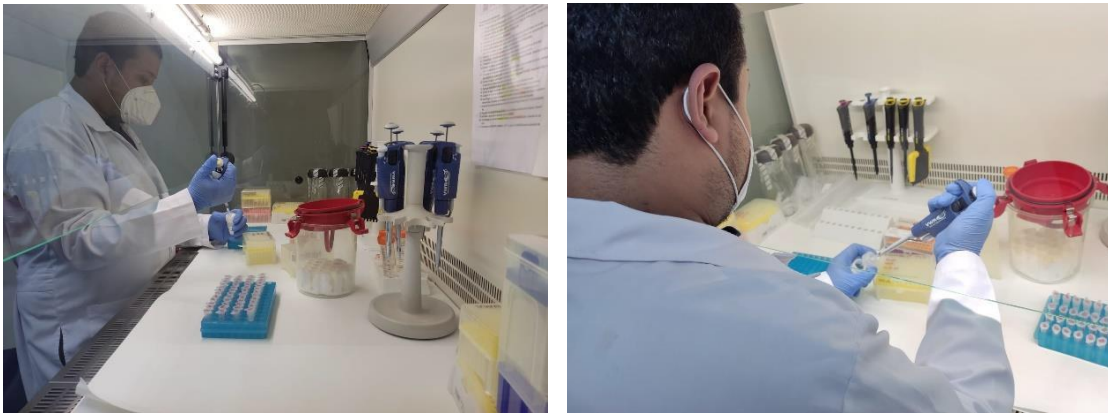


Figura 20: Preparación de la Máster Mix.

### 6.9.4. Control de calidad.

Se utilizaron 3 controles para validar el proceso de amplificación, un control positivo, cepa CL-Brener 1963 [78] proporcionada por CENSALUD, 2 controles negativo, un control de PCR que consistió únicamente en agua ultra pura y un control negativo de extracción.

### 6.9.5. Amplificación.

Finalizado el montaje de la máster mix, se verificó que los tubos no tuvieran burbujas o reactivo atrapado en las paredes, para después ser trasladados al termociclador para su amplificación. Según Gomes y colaboradores en 1998, las condiciones de PCR para programar el termociclador son:

- 1- Desnaturalización inicial por 5 minutos a 95°C.
- 2- Desnaturalización a 95°C por un minuto.
- 3- Alineamiento por 1 minuto a 65°C.
- 4- Extensión final por 10 minutos a 72°C durante un periodo comprendido de 35 ciclos (Figura 21).



**Figura 21:** Condiciones de PCR en la pantalla del termociclador.

Una vez finalizado el proceso de amplificación, las muestras fueron conservadas en un refrigerador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **6.10. Electroforesis.**

### **6.10.1. Materiales y Reactivos utilizados.**

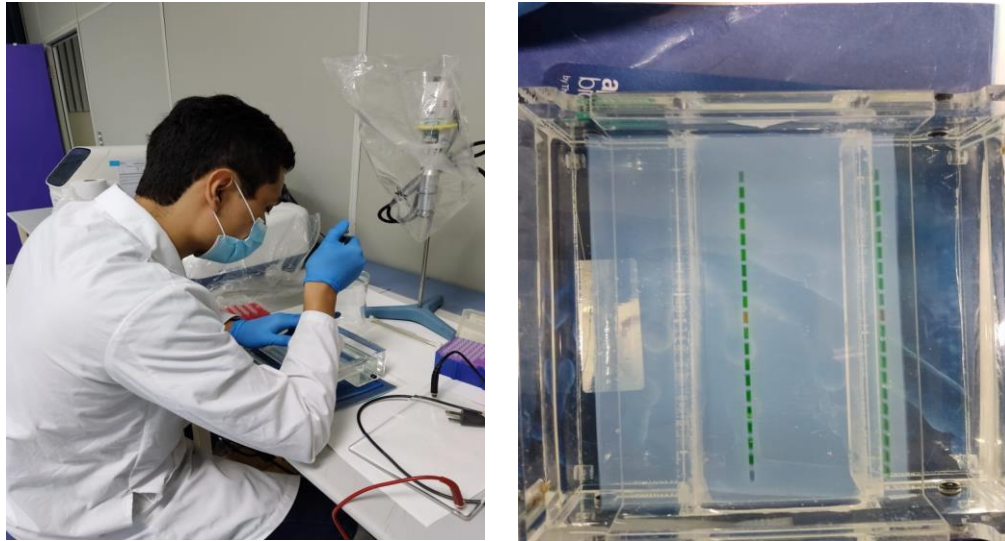
- Micropipetas de 2.5 y 10  $\mu\text{L}$ .
- Puntas estériles de 10  $\mu\text{L}$ .
- Beaker de 350 mL.
- Probeta de 100 mL.
- Cinta adhesiva.
- Agarosa ultrapura
- Gel Red
- Escalera de 50 bp.
- Buffer TBE 1.0X
- Agua destilada.
- Etanol 70%.
- Papel toalla.
- Cuaderno de laboratorio y lapicero.

Para visualizar los productos de PCR se utilizó la técnica de Electroforesis en gel de agarosa, trabajado en una cámara de Electroforesis con capacidad para 20 pocillos, siendo un total de 4 geles realizados, más dos geles de confirmación. Los procesos realizados durante esta etapa fueron:

Con una balanza analítica se realizó el pesaje de la cantidad de agarosa a utilizar, para obtener un gel de Agarosa al 3%, se mezcló con buffer TBE al 1.0X según la cantidad a preparar, siendo calentada en intervalos de 30-10 segundos en un microondas hasta obtener una solución transparente; una vez enfriada, se mezcló con GelRed® (Ver Anexo 6).

Para la tinción de ácidos nucleicos y se transfirió rápidamente al puente de la cámara de electroforesis, previamente montada y preparada con sus respectivos peines, asegurando que estén bien alineados.

Luego procede a retirar cuidadosamente el peine del gel y transferirlo a la cámara de electroforesis, aforando a un nivel deseado con Buffer TBE al 1.0 X; con un mapa de las muestras y controles previamente hecho, se procedió a dispensar las muestras junto una escalera llamada FastGene 50 bp DNA Marker marca Nippon Genetics (Ver Anexo 7), hasta completar todos los pocillos. Se cerró la cámara y se dio inicio a la marcha a 95v por una 1h 30 minutos (Figura 22).

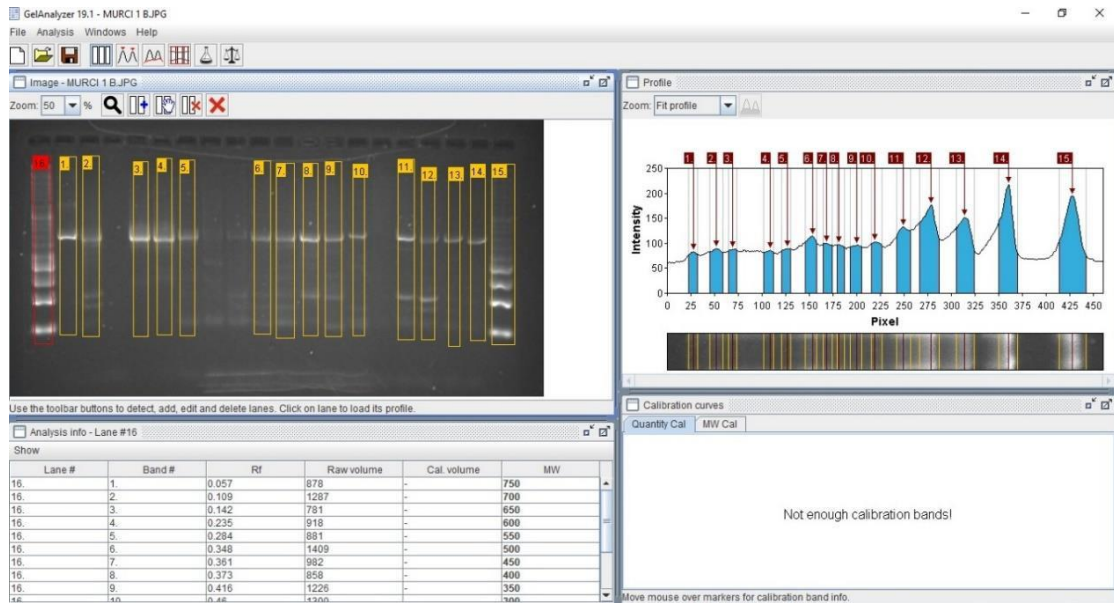


**Figura 22:** Montaje de las muestras en la cámara de electroforesis.

Finalizado el tiempo, se retiró el gel de la cámara, escurriendo el excedente de buffer TBE y se traslada al Transiluminador UV para visualización. Se reportaron y marcaron la cantidad de positivos en el mapa y se realizó un registro fotográfico para su próximo análisis.

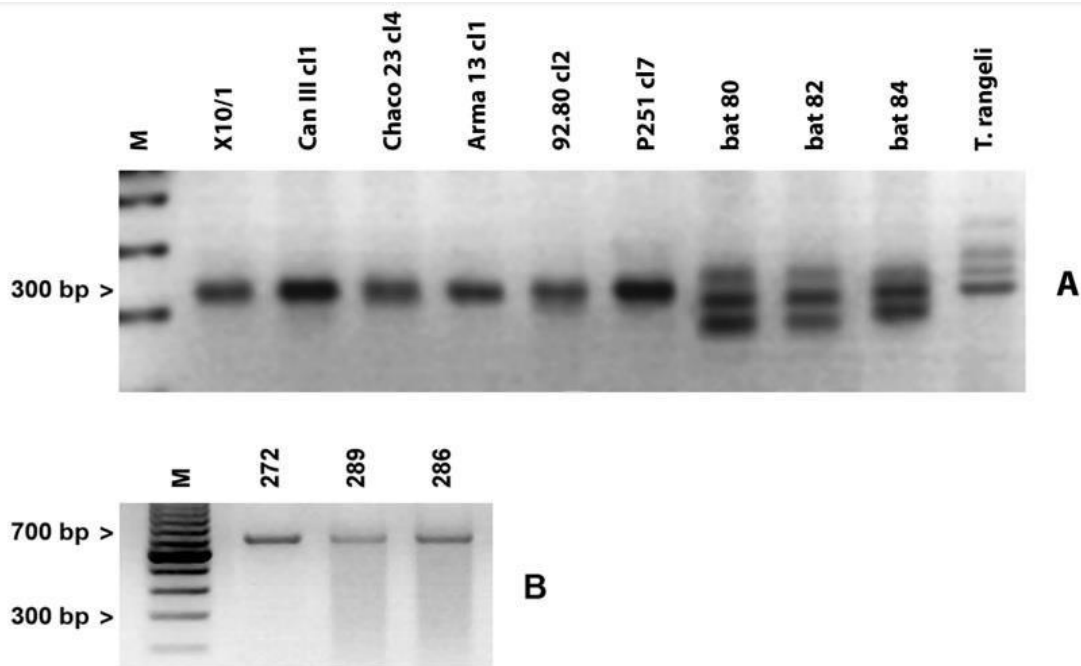
### **6.11. Análisis de resultados.**

Mediante el uso del software GelAnalyzer, versión 19.1, de uso libre [79] (Figura 23) y captura de imágenes de geles, se procedió a analizar los resultados obtenidos en los geles de confirmación, estos se realizaron por dos motivos muy importantes: confirmar todas las muestras positivas a *T. cruzi* o sospechosos a otros Tripanosomátidos y por requerimientos del software dichos geles de confirmación debían llevar un segundo marcador molecular para aumentar la precisión del análisis.



**Figura 23:** Vista Previa del Software Gel Analyzer.

Una vez se obtuvieron los resultados del Software, los pesos moleculares de los amplicones se compararon según la bibliografía citada [13,75,80], para *Trypanosoma rangeli* entre 350 y 380 bp, para *T. cruzi marinkellei* entre 250-350 bp y *T. dionisii* con 600 bp según el ejemplo de la figura 24.



**Figura 24:** Perfiles de Amplificación en Electroforesis. Gel A: las líneas 2 a 7 corresponden a *T. cruzi cruzi* (330 bp), línea 8 a 10 para *T. cruzi marinkellei* (250-380 bp). Gel B: Perfil representativo para *T. dionisii* (600 bp). Fuente: García et al 2012.

## **6.12. Estadística de la Investigación.**

Debido a la naturaleza de nuestra investigación y por los objetivos planteados únicamente se utilizará estadística descriptiva para realizar los análisis y la discusión con otros autores en dicho apartado. Los datos obtenidos fueron agrupados en tablas y gráficos en hojas de cálculo, donde se detalla toda la información recopilada durante la investigación tal como, especies capturadas, estados de los individuos, resultado de PCR, Tripanosomátidos reportados, etc.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Especies capturadas

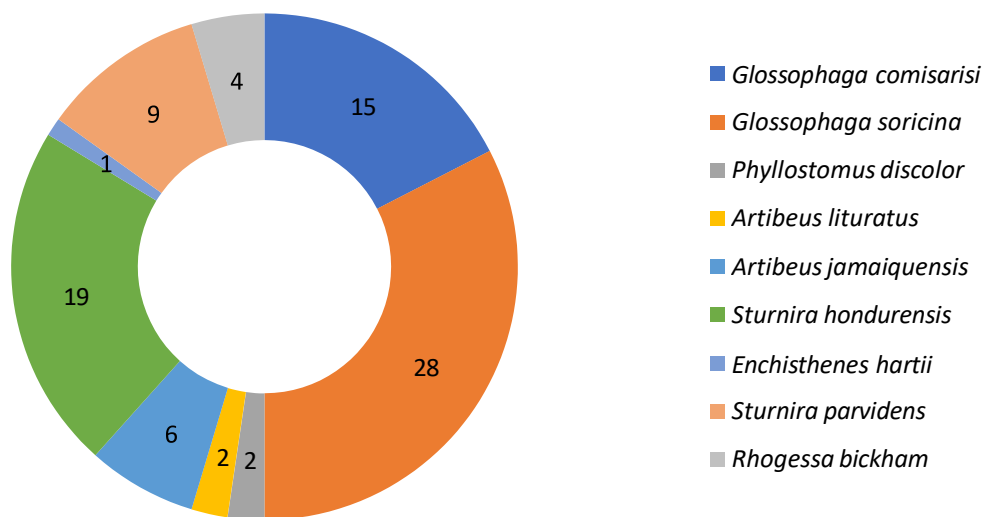
Se capturaron un total de 95 especímenes de murciélagos en 4 viajes de campo, de los cuales 9 fueron excluidos de la fase de laboratorio, por haberse obtenido una cantidad insuficiente de sangre, contándose con 86 especímenes para este estudio; se obtuvieron representantes de las familias Phyllostomidae y Vespertilionidae. La primera contó con 82 individuos distribuidos en 3 subfamilias y 8 especies, mientras que la familia Vespertilionidae contó con 4 individuos pertenecientes a una única especie, la cual fue *Rhogeessa bickhami* (Tabla 9).

Respecto a la familia Phyllostomidae, se encontraron representantes de la subfamilia Glossophaginae, Sternodermatinae y Phyllostominae (en orden de abundancia) siendo la especie más representativo *Glossophaga soricina* con 28 individuos, seguido de *Sturnira parvidens* con 19 especímenes y *Glossophaga commissarisi* con 15 individuos capturados, estas 3 especies constituyeron el 72% de las especies capturadas para este estudio, además la especie menos abundante fue *Enchisthenes hartii* con un solo representante (Figura 25).

**Tabla 9.** Abundancia de especies capturadas.

Abundancia por subfamilias				
Familia	Subfamilia	Especie	Frecuencia	Porcentaje Total
Phyllostomidae	Glossophaginae	<i>Glossophaga comisarisi</i>	15	17%
		<i>Glossophaga soricina</i>	28	33%
	Phyllostominae	<i>Phyllostomus discolor</i>	2	2%
	Sternodermatinae	<i>Artibeus lituratus</i>	2	2%
		<i>Artibeus jamaicensis</i>	6	7%
		<i>Sturnira hondurensis</i>	19	22%
		<i>Enchisthenes hartii</i>	1	1%
		<i>Sturnira parvidens</i>	9	10%
Vespertilionidae	Vespertilioninae	<i>Rhogeessa bickham</i>	4	5%
<b>Total</b>			86	100%

## Frecuencia de las especies capturadas



**Figura 25.** Frecuencia de las especies capturadas.

Respecto a la distribución de los murciélagos capturados por sexo, el 56% de las especies capturadas fueron hembras, y el 44 % restante machos (Tabla 10); respecto al estado de estos, el 77 % de los especímenes capturados eran adultos, un 12 % se encontraban en un estado juvenil y el 11 % restante eran hembras lactantes (Tabla 11), además el sitio de muestreo con mayor abundancia fue el sitio 2 contando con un total de 45 de los especímenes capturados (Tabla 12).

**Tabla 10.** Distribución por sexo de murciélagos capturados.

Por Sexo		
Subfamilias	Macho	Hembra
Glossophaginae	25	18
Phyllostominae	0	2
Stenodermatinae	13	24
Verperilioninae	0	4
<b>Total</b>	38	48
Porcentaje:	44%	56%



**Tabla 11.** Estado de los especímenes capturados

Por Estado			
Subfamilias	Adulto	Juvenil	Lactante
Glossophaginae	34	8	1
Phyllostominae	2	0	0
Stenodermatinae	27	4	6
Verpertilioninae	4	0	0
<b>Total</b>	67	12	7

**Tabla 12.** Sitios de muestreo

Sitios de muestreo		
Lugar	Frecuencia	Porcentaje
Sitio1	24	28%
Sitio 2	45	52%
Sitio 3	17	20%
<b>Total</b>	86	100%

## 7.2. Prevalencia

La prevalencia total observada para *T. cruzi* fue del 30.2% (26/86), adicionalmente hubo 4 muestras que resultaron positivas para la presencia de *Trypanosoma spp*, pero para estas no fue posible determinar la especie, debidos a los métodos empleados para este estudio, por lo cual fueron clasificadas como *Trypanosoma spp*, reportando una prevalencia del 4.6% (4/86), por lo cual, la prevalencia total de Tripanosomátidos fue del 34.8% (30/86). La presencia de Tripanosomátidos fue observada en 30 especímenes distribuidos en 7 especies, 2 familias y 4 subfamilias (Tabla 14). La prevalencia de *T. cruzi* en los especímenes capturados de la familia Phyllostomidae fue del 30.4 % (25/82), mientras que la prevalencia para *Trypanosoma spp* en la misma familia fue del 4.8% (4/82); mientras que la prevalencia de *T. cruzi* para de la familia Vespertilionidae fue del 25% (1/4), para esta última no se observó la presencia de otros Tripanosomátidos respecto a los métodos usados (Figura 26).

En relación con la familia Phyllostomidae, la subfamilia con la mayor prevalencia fue la Glossophaginae contando con el 60% de todas las muestras positivas, aunque esta solo representa el 47.6% (41/86) de los especímenes capturados, por su parte la subfamilia Stenodermatinae, reportó un 33% de positividad (10/30), además la subfamilia Phyllostominae, teniendo una sola especie (*Phyllostomus discolor*) con 2 especímenes capturados, representó un 3% (1/86) de la positividad total (Tabla 15).

**Tabla 13.** Prevalencia de *T. cruzi* en los especímenes capturados

Prevalencia Total		
	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
Positivos	30	35%
Negativos	56	65%
<b>Total</b>	86	100%
Prevalencia:	35%	

**Tabla 14.** Porcentaje total de prevalencia por subfamilia

Prevalencia de Tripanosomátidos respecto a subfamilia				
<b>Subfamilias</b>	<b>Positivos</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Negativos</b>	<b>Porcentaje</b>
Glossophaginae	18	60%	25	45%
Phyllostominae	1	3%	1	2%
Stenodermatinae	10	33%	27	48%
Verpertilioninae	1	3%	3	5%
<b>Total</b>	30	100%	56	100%

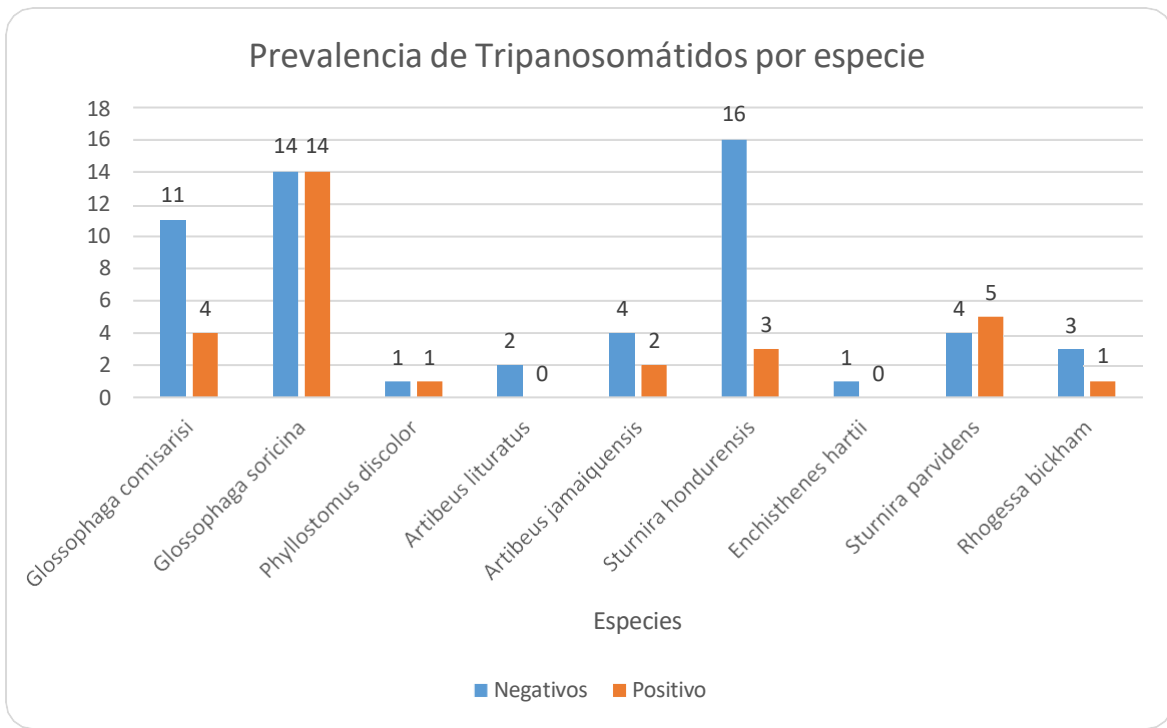
Respecto a las especies capturadas, la especie con más especímenes positivos fue *Glossophaga soricina*, teniendo un 47% del total de las muestras positivas (14/30), representando además el 32% (28/86) de los murciélagos capturados y teniendo una prevalencia total de especie del 50% (Tabla 15).

La segunda especie con el mayor número de individuos fue *Sturnira parvidens* contando con 5 individuos positivos (5/9) y alcanzando una prevalencia del 55%, a su vez le sigue *Glossophaga commissarisi* con (4/15) individuos positivos (Tabla 15). *Phyllostomus discolor*, fue el único representante capturado de la subfamilia Phyllostominae, contando únicamente con dos individuos capturados, y reportando a su vez un espécimen positivo para *T. cruzi* (1/2), seguidos de *Artibeus jamaicensis* con (2/6) y *Sturnira parvidens* (3/19). Además, las únicas especies que resultaron ser positivas para la presencia de *T. rangeli* fueron *G. soricina* y *S. parvidens*, ambas con 2 representantes positivas por especies.

Respecto a los sitios de muestro, el que presentó la mayor cantidad de especímenes positivos a Tripanosomátidos fue el sitio 2 con un 73% (22/30) de la positividad, esto en relación con que fue el sitio que capturó más especímenes para todo el estudio (Figura 26).

**Tabla 15.** Prevalencia de Tripanosomátidos por especie

Resultados de PCR				
Subfamilias	Especie	<i>Trypanosoma cruzi</i>		<i>Trypanosoma spp.</i>
		Positivo	Negativo	Positivos
Glossophaginae	<i>Glossophaga comisarisi</i>	3	11	1
	<i>Glossophaga soricina</i>	13	14	1
Phyllostominae	<i>Phyllostomus discolor</i>	1	1	0
Sternodermatinae	<i>Artibeus lituratus</i>	0	2	0
	<i>Artibeus jamaicensis</i>	2	4	0
	<i>Sturnira hondurensis</i>	3	16	0
	<i>Enchisthenes hartii</i>	0	1	0
	<i>Sturnira parvidens</i>	3	4	2
Verpertilioninae	<i>Rhogessa bickham</i>	1	3	0
<b>Total</b>		<b>26</b>	<b>56</b>	<b>4</b>



**Figura 26.** Prevalencia de Tripanosomátidos por especie.

**Tabla 16.** Prevalencia por sitio de muestreo.

Sitios de muestreo				
<b>Lugar</b>	<b>Positivos</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Negativos</b>	<b>Porcentaje</b>
Sitio 1	3	10%	21	38%
Sitio 2	22	73%	23	41%
Sitio 3	5	17%	12	21%
<b>Total</b>	30	100%	56	100%

## 8. DISCUSIÓN

Para este estudio, se observaron 2 tipos de prevalencia, la primera correspondía a muestras identificadas como *T. cruzi* con un 30.23% y la segunda correspondió a *Trypanosoma spp* (muestras que se identificaron como pertenecientes al género *Trypanosoma*, pero que cuya especie no pudo ser identificada) con 4.6%, reportando una prevalencia total del 34.8% para Tripanosomátidos. Respecto a las muestras clasificadas como *Trypanosoma spp*, existe evidencia que, de acuerdo con el peso molecular observado [13,81], podrían clasificarse como *T. rangeli* (Ver anexo 9 y 10), aunque para clasificarlo filogenéticamente, es necesario utilizar primers específicos para la especie o herramientas de secuenciación, y aunque no podamos clasificarlos certeramente con las herramientas empleadas en este estudio, existe evidencia previa de la circulación de este *T. rangeli* para el país. Para la detección de Tripanosomátidos empleamos el set primers 121 y 122, los cuales amplifican una región mitocondrial altamente conservada entre Tripanosomátidos, en estudios previos, se ha reportado la capacidad del set para detectar y diferenciar a *T. c. cruzi*, *T. c. marinkelli*, *T. rangeli* y *T. dionisii* de acuerdo al patrón de bandas observados [13], pero para este estudio reportamos únicamente la presencia de *T. cruzi* y posiblemente la de *T. rangeli*, señalando una posible limitante del set para identificar a los Tripanosomátidos antes mencionados; este set solo ha sido empleado exitosamente en condiciones de laboratorio con cultivos de cepas ya establecidas. Una de las principales limitantes del set, es la incapacidad de poder detectar coinfecciones de Tripanosomátidos en un mismo hospedero, las cuales se han reportado como comunes en otros estudios previos [11,18,62,80], por lo cual, ante una examinación más extensiva, podría variar las prevalencias de los Tripanosomátidos antes mencionada. Respecto a *T. dionisii*, no podemos descartar la idea de que esté circulando en el país, debido a que se ha reportado previamente en Oceanía, Europa, América y Asia [14,81–83].

Los sitios de muestreos utilizados en esta investigación estaban cerca de centros de urbanos y ciudades importantes en El Salvador y aunque existe muy poca evidencia de la transmisión de la enfermedad de Chagas por parte de Quirópteros a humanos [42,51,84], estos representan un riesgo potencial para la salud de las personas, debido a que traen la presencia del patógeno a la proximidad humana [39,59,85], además es común encontrar quirópteros dentro viviendas, en especial en zonas rurales y semirurales, favoreciendo así las interacciones que puedan surgir del mismo junto con otras especies vectores y reservorios [86], tales como *Triatoma dimidiata* quien tiene la capacidad de alimentarse de murciélagos y es el principal vector de la enfermedad para El Salvador [9,17,89]. Aunque no haya evidencia definitiva, debido a muchos países en Latinoamérica carecen de información actualizada respecto a la prevalencia observada de Chagas, existen indicios de que el país tiene una de las tasas más altas de Chagas de toda Latinoamérica [2,7,90,91]. Aunque en este estudio, no abordamos la parte de variabilidad genética de *T. cruzi* presente en los especímenes capturados, y tampoco comparamos esta con respecto a las cepas de interés clínico, podemos afirmar que es un paso clave en la comprensión de los ciclos de transmisión selvática de *T. cruzi* para el país y reforzar aún más la evidencia del rol que juegan los murciélagos como reservorios de patógenos [88]. Es importante reconocer que los hallazgos

de este estudio presentan un patrón similar de prevalencia a la encontrada en otros países de Latinoamérica [10,13,18,27,61,62,92–94], siendo el estudio hecho en Chiapas 2022, el que se observó la mayor similitud respecto a prevalencia, métodos empleados y especies capturadas.

Respecto a la prevalencia de las especies capturadas, la especie con más individuos positivos es *Glossophaga soricina*, reportando 14/28 individuos positivos capturados, aunque no es el primer estudio en reportar la presencia de Tripanosomátidos en esta especie [95], no deja de señalar el rol epidemiológico que esta especie tiene como reservorio de Tripanosomátidos, es además importante denotar que los hábitos alimenticios de esta especie son nectarívoros, señalando una posible ruta de contagio no ligada al consumo de insectos portadores de Tripanosomátidos, si no a la posible interacción de esta especie con otros murciélagos infectados u vectores como triatominos. Por su parte *Stunira parvidens*, cuyos hábitos alimenticios son omnívoros, reportó una prevalencia mayor al 50% (5/9) para Tripanosomátidos, aunque esta no puede considerarse representativa debido al bajo número de individuos capturados, si podemos señalar su rol epidemiológico como reservorio [95]. Aunque los murciélagos sean considerados reservorios de Tripanosomátidos en la naturaleza, esto no significa que estos no estén siendo afectados por el patógeno y que en consecuencia reduzca su posibilidad para sobrevivir en el medio, hacen falta muchos más estudios, para dilucidar el rol ecológico, que los Tripanosomátidos juegan respecto como hospederos en Quiropteros [39,84,88,96]. Respecto a otras especies capturadas como *Phyllostomus discolor* y *Artibeus jamaicensis*, muy pocos especímenes fueron capturados en este estudio para hacer estimaciones respecto la prevalencia de dichas especies, aunque la última tiene varios reportes de infecciones con Tripanosomátidos [61,95,97].

Por último, no podemos señalar que el porcentaje de infección observado en este estudio sea el mismo para todo el país, esto debido al número bajo de murciélagos capturados y la poca representatividad de las especies muestreada. Asimismo, aunque muchas especies de Filostomidos ya cuentan con reportes de infecciones con Tripanosomátidos, en este estudio encontramos 3 nuevas especies que previamente no contaban con ningún registro para Tripanosomátidos, las cuales están casi restringidas a la región centroamericana, estas especies son *Glossophaga commissarisi*, *Stunira hondurensis* y *Rhogeessa bickhami*, las cuales no tenían ningún reporte previo a infecciones con Tripanosomátidos.

## 9. CONCLUSIONES.

1. En base a los análisis de los resultados obtenidos, podemos afirmar que prevalencia de *T. cruzi* obtenida en este estudio, es similar a la reportada en otras investigaciones semejantes esto concuerda con el hecho que, nuestro país es un área endémica no solo de *T. cruzi* sino además para otros Tripanosomátidos,
2. Los métodos moleculares empleados para este estudio fueron incapaces de determinar a otras especies de Tripanosomátidos presentes, a pesar de que previamente se había de reportado la capacidad del set de primers para diferenciar a *T. cruzi cruzi* de *T. cruzi marinkelli* además de identificar a *T. dionisii* y *T. rangeli*, en estudios donde se evaluaron la capacidad del set de primers, estos se habían llevado a cabo con cepas ya estandarizadas de laboratorio y sin tomar en cuenta coinfecciones, lo cual ha resultado muy común en otros estudios de su tipo, en el caso de las muestras que fueron clasificadas como *Trypanosoma spp*, fue imposible a partir del patrón de banda generado, discriminar si pertenecían o no a *T. rangeli*.
3. La subfamilia con la mayor abundancia y prevalencia para Tripanosomátidos fue la Glossophaginae, esta subfamilia en otros estudios previos realizados en Sudamérica había reportado una prevalencia alta para Tripanosomátidos, aunque la mayoría de estudios se había enfocado en *Carollia perspicillata* debido a su abundancia en los trópicos, esta no fue reportada en este estudio, aunque si ha sido reportada su presencia para el país, respecto a *Glossophaga soricina* esta especie solo cuenta un reporte para Tripanosomátidos, por último, este estudio representa el primer reporte infección de *T. cruzi* para *Glossophaga commissarisi*.
4. A pesar de que este estudio es un primer paso para dilucidar la relación entre la interacción entre los ciclos selváticos y los ciclos domiciliarios en nuestro país, consideramos que aun hace falta muchos más estudios para entender la inusual alta prevalencia de la enfermedad de Chagas en El Salvador.

## 10. RECOMENDACIONES

- Incrementar los sitios de muestreo al resto de regiones del país, tratando de abarcar tanto la zona norte, occidente, oriente y paracentral, para así tener una mayor referencia de cómo es la prevalencia en esas regiones y qué otras especies de Tripanosomátidos podrían estar en el país; además de ampliar el estudio hasta caracterización molecular de *Trypanosoma cruzi cruzi* para determinar cepas circulantes y estudios de filogenética, para comparar nuestras cepas y especies de Tripanosomátidos con los reportados en otros países.
- Realizar más estudios con reservorios naturales tanto de parásitos, bacterias y virus que son patógenos para el ser humano o agentes vectoriales de enfermedades en murciélagos u otros mamíferos, para que, mediante la información obtenida, se logre generar conciencia en la conservación de las áreas forestales desde un punto de vista epidemiológico y así, evitar que nuevas enfermedades de origen zoonótico entren al ambiente antropogénico.
- Realizar tamizajes comunitarios en zonas de alta incidencia de la enfermedad de Chagas para así, determinar la presencia de casos crónicos y agudo; así como proporcionar materiales y equipos para realizar diagnóstico, tanto de la enfermedad de Chagas, como otras patologías a pacientes febriles o de alto riesgo.



## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Rassi A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Vol. 26, Infectious Disease Clinics of North America. 2012. p. 275–91.
2. Sasagawa E, Guevara de Aguilar AV, Hernández de Ramírez MA, Romero Chévez JE, Nakagawa J, Cedillos RA, et al. Acute chagas disease in El Salvador 2000-2012 - Need for surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(2):256–8.
3. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet* [Internet]. 2018 Jan 6 [cited 2022 Aug 5];391(10115):82–94. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673617316124/fulltext>
4. Echeverria LE, Morillo CA. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Vol. 33, Infectious Disease Clinics of North America. 2019.
5. Tzizik DM, Borchardt RA. Chagas disease. *J Am Acad Physician Assist*. 2018 Dec 1;31(12):30–3.
6. OPS. La enfermedad de Chagas en El Salvador, evolución histórica y desafíos para el control. OPS; 2010.
7. Sasagawa E, Guevara de Aguilar AV, Hernández de Ramírez MA, Romero Chévez JE, Nakagawa J, Cedillos RA, et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors in El Salvador between 2001 and 2011. *J Infect Dev Ctries*. 2014;
8. Álvarez-Hernández D-A, Franyuti-Kelly G-A, Díaz-López-Silva R, González-Chávez A-M, González-Hermosillo-Cornejo D, Vázquez-López R. Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. *Rev Médica del Hosp Gen México*. 2016 Oct 19;81(3):154–64.
9. Hashimoto K, Schofield CJ. Elimination of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Parasit Vectors* [Internet]. 2012 Dec 22 [cited 2019 Nov 16];5(1):45. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-45>
10. Jansen AM, Xavier SC, Rodrigues A Luiz. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–25.
11. Bento EC, Gómez-Hernández C, Batista LR, Anversa L, Pedrosa AL, Lages-Silva E, et al. Identification of bat trypanosomes from Minas Gerais state, Brazil, based on 18S rDNA and Cathepsin-L-like targets. *Parasitol Res*. 2018;117(3):737–46.
12. Ramírez JD, Turriago B, Tapia-Calle G, Guhl F. Understanding the role of dogs (*Canis lupus familiaris*) in the transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Colombia. *Vet Parasitol*. 2013 Sep 1;196(1–2):216–9.
13. García L, Ortiz S, Osorio G, Torrico MC, Torrico F, Solari A. Phylogenetic analysis of Bolivian bat trypanosomes of the subgenus *schizotrypanum* based on cytochrome

- b sequence and minicircle analyses. PLoS One. 2012;7(5).
14. Hodo CL, Goodwin CC, Mayes BC, Mariscal JA, Waldrup KA, Hamer SA. Trypanosome species, including *Trypanosoma cruzi*, in sylvatic and peridomestic bats of Texas, USA. Acta Trop [Internet]. 2016;356(6336):241–50. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/sci/356/6336/438.full.pdf>
  15. Pinto CM, Ocaña-Mayorga S, Tapia EE, Lobos SE, Zurita AP, Aguirre-Villacís F, et al. Bats, trypanosomes, and triatomines in Ecuador: New insights into the diversity, transmission, and origins of *trypanosoma cruzi* and chagas disease. PLoS One. 2015 Oct 14;10(10).
  16. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. 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. 2009;136(6):641–55.
  17. Aiga H, Sasagawa E, Hashimoto K, Nakamura J, Zúniga C, Chévez JER, et al. Chagas Disease: Assessing the Existence of a Threshold for Bug Infestation Rate. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2012 Jun [cited 2019 Jul 24];86(6):972. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22665603>
  18. Pegorari P de O, Gómez-Hernández C, Barbosa CG, Rezende-Oliveira K, Pedrosa AL, Ramirez JD, et al. Bat trypanosomatids (first report of *T. wauwau*) in Triângulo Mineiro, Brazil. bioRxiv [Internet]. 2018 Jun 14 [cited 2019 Sep 3];347146. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/06/14/347146.full.pdf>
  19. Reid FA. A Field Guide to the Mammals of Central America and Southeast Mexico. Segunda ed. Vol. Volumen 1, Oxford, New York: Oxford University Press. Oxford University Press (OUP); 2009.
  20. Medina-Fitoria A. MURCIÉLAGOS DE NICARAGUA Guía de campo. 2014.
  21. Villa Ramírez B. Biología de los murciélagos Hematófagos. Cienc Vet. 1976; 1:85–101.
  22. Romero V, Brito J, Camacho M, Vallejo AF. *Glossophaga soricina* [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 11]. Available from: <https://bioweb.bio/faunaweb/mammaliaweb/FichaEspecie/Glossophaga soricina>
  23. Williams SL, Genoways HH. Subfamily Phyllostominae Gray, 1825 from Mammals of South America. Mammal Pap Univ Nebraska State Museum [Internet]. 2007;113(January):255–99. Available from: <https://digitalcommons.unl.edu/museummammalogyhttps://digitalcommons.unl.edu/museummammalogy/113>
  24. Vallejo AF, Boada C. *Carollia perspicillata* [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 11]. Available from: <https://bioweb.bio/faunaweb/mammaliaweb/FichaEspecie/Carollia perspicillata>
  25. Reis NR dos, Lima IP de, Peracchi AL. Morcegos (Chiroptera) da área urbana de Londrina, Paraná, Brasil. Rev Bras Zool. 2002;19(3):739–46.

26. Birkett, K., Weidman, K., Woo Y. ADW: Vespertilionidae: INFORMATION [Internet]. [cited 2022 Apr 11]. Available from: <https://animaldiversity.org/accounts/Vespertilionidae/>
27. Perez-Molina JA, Poveda C, Martinez-Perez A, Guhl F, Monge-Maillo B, Fresno M, et al. Distribution of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Bolivian migrants in Spain. *Infect Genet Evol.* 2014 Jan; 21:440–2.
28. WHO. WHO | Chagas disease (American trypanosomiasis). WHO [Internet]. 2019 [cited 2019 Oct 19]; Available from: <https://www.who.int/chagas/en/>
29. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. Vol. 184, *Acta Tropica*. Elsevier B.V.; 2018. p. 38–52.
30. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. Actualización en enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016 Feb 1;34(2):132–8.
31. Sánchez E, Vélez MC, Restrepo M, Marín JS, Gallego D. Tripanosomiasis americana, una mirada desde el tratamiento [Internet]. 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijtm.2016.05.001>
32. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A, Marin-Neto JA, Dantas RO, et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States A Systematic Review [Internet]. [cited 2021 Feb 20]. Available from: <https://jamanetwork.com/doi/full/10.1001/jama.2020.19877>
33. Ministerio de Salud. Norma tecnica para la prevención y control de la enfermedad de Chagas. 2011. 74 p.
34. Balouz V, Agüero F, Buscaglia CA. Chagas Disease Diagnostic Applications: Present Knowledge and Future Steps. *Adv Parasitol.* 2017; 97:1–45.
35. Ponce C. Current situation of Chagas disease in Central America. Vol. 102, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro; 2007.
36. Quirós-Gómez Ó, Jaramillo N, Angulo V, Parra-Henao G. *Triatoma dimidiata* in Colombia: Distribution, ecology and epidemiological importance. *Biomedica.* 2017 Jun 1;37(2):274–85.
37. Peterson JK, Yoshioka K, Hashimoto K, Caranci A, Gottdenker N, Monroy C, et al. Chagas Disease Epidemiology in Central America: an Update. Vol. 6, *Current Tropical Medicine Reports*. Springer Verlag; 2019. p. 92–105.
38. Corrigendum “A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia” [*International Journal for Parasitology* 29 (2) (1999) 331–339].
39. Hamilton PB, Teixeira MMG, Stevens JR. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: The “bat seeding” hypothesis. *Trends Parasitol* [Internet]. 2012;28(4):136–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.01.006>
40. Diosque P, Tomasini N, Lauthier JJ, Messenger LA, Monje Rumi MM, Ragone PG, et al. Optimized Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;

41. Berry ASF, Salazar-Sánchez R, Castillo-Neyra R, Borrini-Mayorí K, Chipana-Ramos C, Vargas-Maquera M, et al. Sexual reproduction in a natural *Trypanosoma cruzi* population. Bartholomeu DC, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2019 May 20 [cited 2019 Aug 10];13(5): e0007392. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007392>
42. Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E, et al. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. Zoonoses Public Health. 2014;61(7):477–9.
43. Dario MA, da Rocha RMM, Schwabl P, Jansen AM, Llewellyn MS. Small subunit ribosomal metabarcoding reveals extraordinary trypanosomatid diversity in Brazilian bats. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(7):1–15.
44. Barrett ADT, Stanberry LR, Bhatia V, Wen J-J, Zacks MA, Jain Garg N. American Trypanosomiasis. Vaccines Biodefense Emerg Neglected Dis [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2019 Oct 11];1423–50. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012369408900069X>
45. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Vol. 12, Infection, Genetics and Evolution. 2012. p. 240–53.
46. Ramírez, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA. Chagas cardiomyopathy manifestations and *trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients. PLoS Negl Trop Dis. 2010;
47. Dos Santos FCB, Lisboa C V., Xavier SCC, Dario MA, Verde RDS, Calouro AM, et al. *Trypanosoma* sp. diversity in Amazonian bats (Chiroptera; Mammalia) from Acre State, Brazil. Parasitology. 2018 May 1;145(6):828–37.
48. Eshar D, Weinberg M. Venipuncture in bats. Lab Anim (NY). 2010;
49. Cavazzana M, Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira ÂCV, Veludo HH, et al. 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. Int J Parasitol. 2010 Mar;40(3):345–55.
50. Ellison LE, Valdez EW, Cryan PM, O'shea TJ, Bogan MA. Standard Operating Procedure for the Study of Bats in the Field. 2013.
51. Villena FE, Gomez-Puerta LA, Jhonston EJ, Del Alcazar OM, Maguiña JL, Albuja C, et al. First report of *Trypanosoma cruzi* infection in salivary gland of bats from the Peruvian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2018;99(3):723–8.
52. Barros JHS, Lima L, Schubach AO, Teixeira MMG. *Trypanosoma madeirae* sp. n.: A species of the clade *T. cruzi* associated with the neotropical common vampire bat *Desmodus rotundus*. Int J Parasitol Parasites Wildl [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2019 Sep 6]; 8:71–81. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213224418301524?via%3Dihub>

53. Souto RP, Vargas N, Zingales B. *Trypanosoma rangeli*: Discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Exp Parasitol*. 1999;91(4):306–14.
54. Schijman AG. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. Vol. 184, *Acta Tropica*. Elsevier B.V.; 2018. p. 59–66.
55. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007;103(3):195–200.
56. Nichols MD, Lord WD, Haynie ML, Brennan RE, Jackson VL, Monterroso WS. *Trypanosoma cruzi* in a mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis*) in Oklahoma, USA. *J Wildl Dis*. 2019 Apr 1;55(2):444–8.
57. Dorn PL, McClure AG, Gallaspy MD, Waleckx E, Woods AS, Monroy MC, et al. The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(9):1–15.
58. Moratelli R, Calisher CH, Moratelli R, Calisher CH. Bats and zoonotic viruses: ¿can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2015 feb [cited 2019 Sep 25];110(1):1–22. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762015000100001&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000100001&lng=en&tlng=en)
59. Melaun C, Werblow A, Busch MW, Liston A, Klimpel S. Bats as Potential Reservoir Hosts for Vector-Borne Diseases. In 2014. p. 25–61.
60. Lima L, Espinosa-Álvarez O, Pinto CM, Cavazzana M, Pavan AC, Carranza JC, et al. 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* [Internet]. 2015 Dec 23 [cited 2019 Aug 9];8(1):657. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/657>
61. Pinto M, Kalko E, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail V. 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. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2012;12(6):1328–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.013>
62. Ramírez J, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendón LM, Hincapié E, et al. Trypanosome species in neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infect Genet Evol*. 2014 Mar; 22:250–6.
63. Dario M, Lisboa CV, Costa LM, Moratelli R, Nascimento MP, Costa LP, et al. High *Trypanosoma* spp. diversity is maintained by bats and triatomines in Espírito Santo state, Brazil. *PLoS One*. 2017;12(11).
64. Lourenço JLM, Minuzzi-Souza TTC, Silva LR, Oliveira AC, Mendonça VJ, Nitz N,

- et al. High frequency of trypanosomatids in gallery forest bats of a Neotropical savanna. *Acta Trop* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2019 Aug 9]; 177:200–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X17302991>
65. Giron L. Identificación y distribución de los murciélagos del sector los Andes del volcán de Santa Ana, complejo los volcanes El Salvador. Universidad de El Salvador; 2005.
  66. Fajardo Solís ME, Abrego de Medina D del C, Pineda Peraza LA. Composición y Diversidad de Quirópteros del Parque Nacional San Diego y San Felipe Las Barras, Metapan, Durante la Estación Seca a la Estación Lluviosa en el Año 2010. Tesis. Universidad de El Salvador; 2011.
  67. Larios RCA. Distribución altitudinal de murciélagos filostómidos (Chiroptera: Phyllostomidae) en la zona central de Chalatenango, El Salvador. Universidad de El Salvador. 2019.
  68. Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop*. 2015 Jun 3;151(1):166–77.
  69. Mora JM. Clave para la Identificación de las Especies de Murciélagos de Honduras. *Ceiba*. 2017;54(2):93–117.
  70. Medellín R, Arita H, Sánchez O. IDENTIFICACIÓN DE LOS MURCIÉLAGOS DE MÉXICO, CLAVE DE CAMPO SEGUNDA EDICIÓN. Ciudad de México; 2007.
  71. Rodríguez B. Clave de campo para los murciélagos de Costa Rica [Internet]. 1999. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/29445008>
  72. Vergara C, Muñoz G, Martínez G, Apt W, Zulantay I. Detection of *Trypanosoma cruzi* by PCR in adults with chronic Chagas disease treated with nifurtimox. *PLoS One*. 2019;14(8).
  73. Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SDJ, Galvão LMC, Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol*. 1998;
  74. Ramírez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-Neto JA, et al. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2009 [cited 2022 Apr 3];47(12):3945–51. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jcm>
  75. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. 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*. 1994;51(6):771–7.
  76. Britto C, Cardoso MA, Vanni CMM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, et al. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*. 1995

Apr;110(3):241–7.

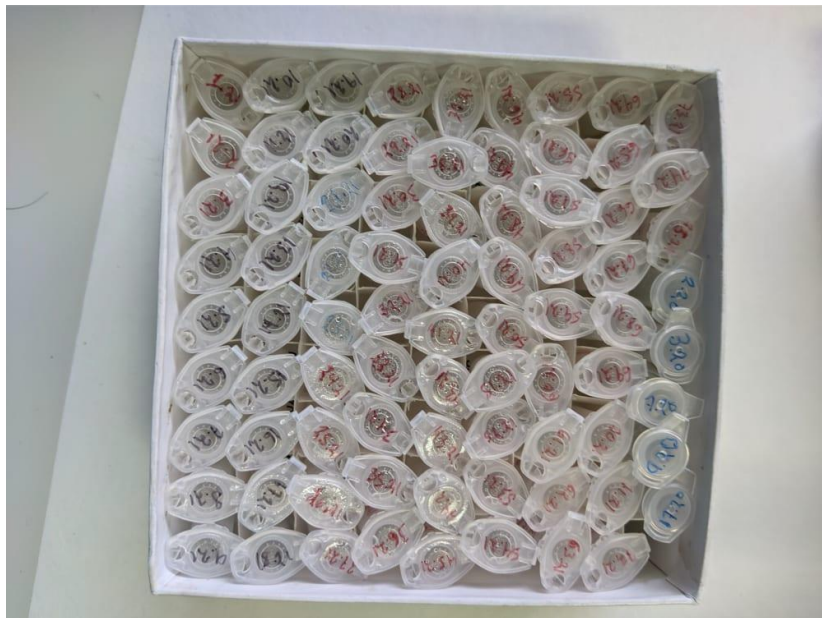
77. Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Vol. 72, *Acta Tropica*. 1999.
78. Brener Z. Comparative studies of different strains of *trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1965;59(1):19–26.
79. Istvan Lazar Sr & ILJ. GelAnalyzer [Internet]. [cited 2022 Apr 3]. Available from: <http://www.gelanalyzer.com/?i=1>
80. Botero A, Ortiz S, Muñoz S, Triana O, Solari A. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* of Colombia using minicircle hybridization tests. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 nov;68(3):265–70.
81. Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;62(1):45–52.
82. Martínez-Perez A, Poveda C, Ramírez JD, Norman F, Gironés N, Guhl F, et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi*'s Discrete Typing Units in a cohort of Latin American migrants in Spain. *Acta Trop*. 2016 May 1; 157:145–50.
83. Qiu Y, Kajihara M, Harima H, Hang'ombe BM, Nakao R, Hayashida K, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Trypanosoma* spp. detected from striped leaf-nosed bats (*Hipposideros vittatus*) in Zambia. *Int J Parasitol Parasites Wildl* [Internet]. 2019 Aug [cited 2019 Aug 28]; 9:234–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31198682>
84. Clément L, Dietrich M, Markotter W, Fasel NJ, Monadjem A, López-Baucells A, et al. Out of Africa: The origins of the protozoan blood parasites of the *Trypanosoma cruzi* clade found in bats from Africa. *Mol Phylogenet Evol*. 2020;
85. Wang LJ, Han HJ, Zhao M, Liu JW, Luo LM, Wen HL, et al. *Trypanosoma dionisii* in insectivorous bats from northern China. *Acta Trop*. 2019 May 1; 193:124–8.
86. Bergner LM, Becker DJ, Tello C, Carrera JE, Streicker DG. Detection of *Trypanosoma cruzi* in the saliva of diverse neotropical bats. *Zoonoses Public Health*. 2021 May 1;68(3):271–6.
87. Bennett M. Bats and human emerging diseases. Vol. 134, *Epidemiology and Infection*. 2006. p. 905–7.
88. Austen JM, Barbosa AD. Diversity and epidemiology of bat trypanosomes: A one health perspective. Vol. 10, *Pathogens*. 2021.
89. Zamora DMB, Hernández MM, Torres N, Zúniga C, Sosa W, De Abrego V, et al. Information to act: Household characteristics are predictors of domestic infestation with the Chagas vector *Triatoma dimidiata* in central America. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 jul 1;93(1):97–107.

90. Requena-Méndez A, Aldasoro E, de Lazzari E, Sicuri E, Brown M, Moore DAJ, et al. Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2).
91. El Ghouzzi MH, Boiret E, Wind F, Brochard C, Fittere S, Paris L, et al. Testing blood donors for Chagas disease in the Paris area, France: First results after 18 months of screening. *Transfusion*. 2010;50(3):575–83.
92. Anthony SJ, Ojeda-Flores R, Rico-Chávez O, Navarrete-Macias I, Zambrana-Torrelío CM, Rostal MK, et al. Coronaviruses in bats from Mexico. *J Gen Virol*. 2013 May 1;94(PART 5):1028–38.
93. de Oliveira FM, Costa LHC, de Barros TL, Rauschkolb Katsuda Ito PK, Colombo FA, de Carvalho C, et al. First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban areas. *Acta Trop*. 2015 oct 1; 150:176–81.
94. Alves FM, Rangel DA, Vilar EM, Pavan MG, Moratelli R, Roque ALR, et al. *Trypanosoma* spp. Neobats: Insights about those poorly known trypanosomatids. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2021 Dec 1; 16:145–52.
95. Torres-Castro M, Cuevas-Koh N, Hernández-Betancourt S, Noh-Pech H, Estrella E, Herrera-Flores B, et al. Natural infection with *Trypanosoma cruzi* in bats captured in Campeche and Yucatán, México. *Biomedica*. 2021;41(Supplement1 1):1–28.
96. Velásquez-Ortiz N, Herrera G, Hernández C, Muñoz M, David Ramírez J. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi*: Geographical and biological distribution in the americas. Available from: [www.nature.com/scientificdata](http://www.nature.com/scientificdata)
97. Cottontail VM, Kalko EKV, Cottontail L, Wellinghausen N, Tschapka M, Perkins SL, et al. High local diversity of *Trypanosoma* in a common bat species, and implications for the biogeography and taxonomy of the *T. cruzi* clade. *PLoS One*. 2014;9(9).

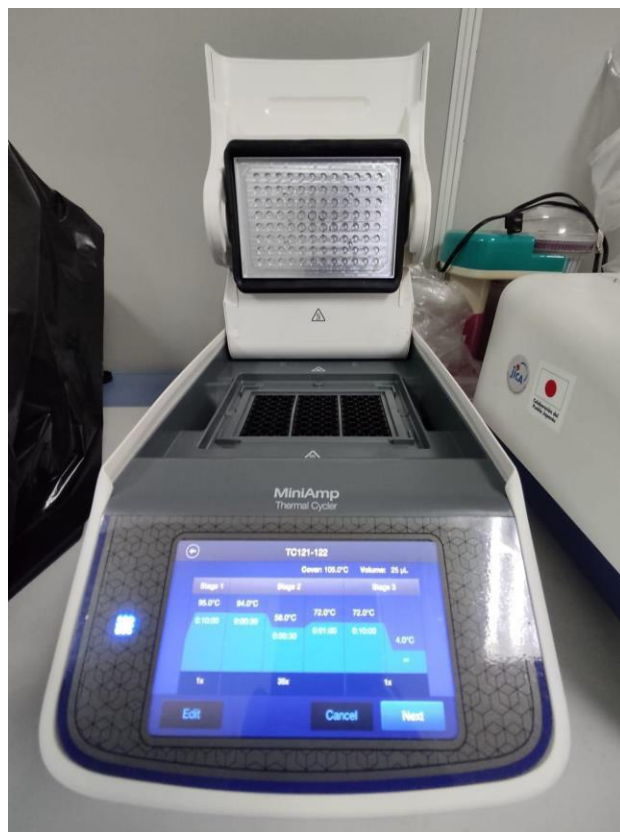




**Anexo 3.** Muestras de ADN extraídas.



**Anexo 4.** Termociclador Mini Amp, Applied Biosystems™



**Anexo 5.** Gotaq® Green Master Mix



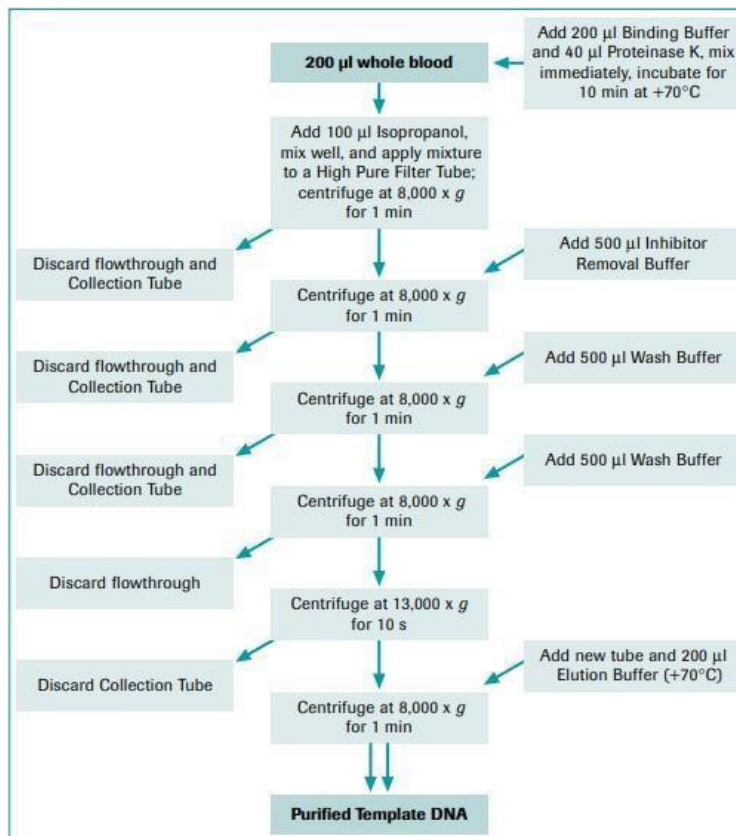
**Anexo 6.** Gel Red®, Biotum



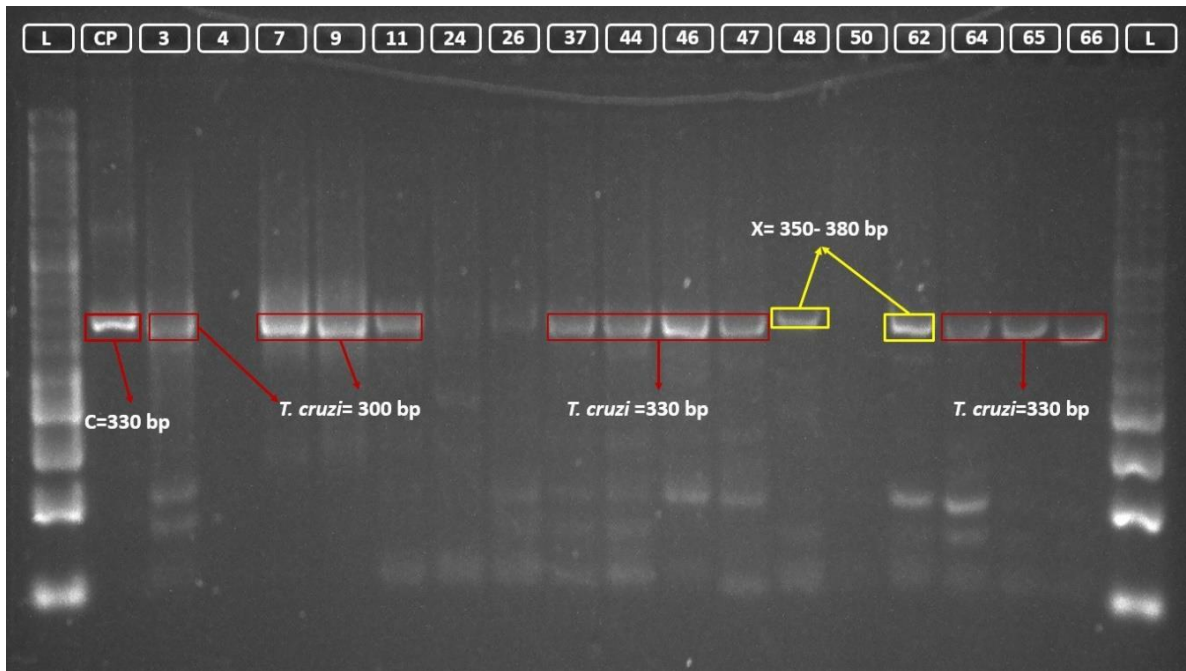
**Anexo 7.** Fast Gene 50 bp Ladder, Nippon Genetics.



**Anexo 8.** Protocolo de Extracción para sangre completa del kit High Pure Template Preparation  
Marca: Roche



**Anexo 9.** Gel de Confirmación para *Trypanosoma cruzi* y otras especies de Tripanosomátidos.



**Anexo 10.** Segundo gel de confirmación para *Trypanosoma cruzi* y otras especies de Tripanosomátidos.

