



Universidad del  
**Rosario**

**Identificación de *Trypanosoma* spp. y *Leishmania* spp. en murciélagos del  
departamento de Casanare**

**Maria Fernanda Zúñiga González**

**Director**  
**Juan David Ramírez González Ph.D.**

**Universidad del Rosario**  
**Facultad de Ciencias Naturales**  
**Bogotá, Colombia**  
**2021**

# Identificación de Trypanosoma spp. y Leishmania spp. en murciélagos del departamento de Casanare

Maria Fernanda Zúñiga González

Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de:  
Bióloga

Director  
Juan David Ramírez González Ph.D.

Tutor  
Diana Carolina Hernández Castro

Facultad de Ciencias Naturales  
Biología  
Universidad del Rosario  
Bogotá, Colombia  
2021

# Identificación de *Trypanosoma spp.* y *Leishmania spp.* en murciélagos del departamento de Casanare

Maria Fernanda Zúñiga, Diana Carolina Hernández, Adriana Castillo Castañeda, Andrés Camilo Zúñiga González, Plutarco Urbano, Juan David Ramírez González

## Resumen

Los murciélagos constituyen el 20% de las especies de mamíferos en la actualidad, su capacidad de dispersión y colonización de nuevos nichos ha permitido que estos vertebrados estén expuestos a diferentes protozoos, como especies de los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*. Existen pocos estudios que relacionen la co-infección de ambos géneros en los murciélagos, por lo que el objetivo de este trabajo fue detectar ADN de *Trypanosoma* y *Leishmania* en murciélagos procedentes del departamento de Casanare, Colombia y establecer la frecuencia de infección de ambos géneros. De los 172 murciélagos capturados, se encontraron 18 individuos correspondientes a las especies *Phyllostomus hastatus*, *Myotis spp.* y *Carollia perspicillata*, que presentaban ambos géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*. El total de murciélagos infectados con *Trypanosoma spp.* fue de 63 y 20 para *Leishmania spp.*. Este estudio refuerza la importancia de los murciélagos como reservorios de dos kinetoplastidos causantes de enfermedades endémicas en Colombia.

## Introducción

Los murciélagos, además de ser los únicos mamíferos voladores (1), representan uno de los órdenes más diversos dentro de los animales placentarios (2,3). Por su diversidad, han podido explotar distintos nichos en todos los continentes, a excepción de la Antártida (4). Colombia es el país con mayor cantidad de especies en América, con cerca de 200 reportadas hasta la actualidad (5). Su diversidad está relacionada con la variedad de dietas que presentan, que van desde los que se alimentan de sangre y carne de vertebrados, los que cazan pequeños artrópodos hasta el consumo de frutos y néctar (6). Estos hábitos ayudan al control de plagas y polinización de plantas de importancia económica. Por esta razón, estos mamíferos pueden ser encontrados desde sitios de poca vegetación y pastizales hasta el dosel de los bosques (7). Como consecuencia de los hábitos variados de las distintas especies de murciélagos, estos son reservorios ideales para parásitos unicelulares (2).

Los tripanosomátidos son uno de los parásitos encontrados en los murciélagos, estos protozoos incluyen géneros heteroxenos con ciclos alternos entre huéspedes invertebrados (generalmente artrópodos hematófagos) y vertebrados (8). *Trypanosoma* es uno de estos géneros y comprende flagelados que infectan a todas las clases de vertebrados, incluyendo los quirópteros, en todos los continentes y son transmitidos por varios grupos de invertebrados (9). Este género se ha diferenciado en al menos 10 clados definidos, los cuales son: *T. brucei*, *T. cruzi*, *T. lewisi*, *T. theileri*, *T. grayi*, *T. cyclops*, aviar, cocodrilo, lagartos y serpientes, y clados acuáticos (10–13). De estos se destaca la especie *T. cruzi* encontrada en mamíferos, la cual es responsable de la enfermedad de Chagas en América, que afecta aproximadamente 6 millones de personas en el mundo y 437.960 personas en Colombia según estimaciones del 2010 (14,15).

Además de *Trypanosoma*, otro género tripanosomátido de gran importancia es *Leishmania*, el cual comprende 30 especies que también infectan mamíferos y son transmitidas por insectos hematófagos de la familia Psychodidae, los cuales, tal como el parásito que transmiten, están distribuidos en regiones tropicales y subtropicales (16,17). Este género se divide en 3 subgéneros según el sitio de desarrollo del parásito en el insecto: *Leishmania (Leishmania)*, *Leishmania (Viannia)* y *Leishmania (Sauroleishmania)* [18]. Según la especie de *Leishmania*

puede presentarse las tres formas clínicas principales: cutánea, mucosa o visceral (19). En el reporte más reciente para Colombia en 2016, se contabilizaron 10.743 casos de leishmaniasis, de las cuales 10.561 correspondieron a la forma cutánea, 122 a la forma mucosa y 60 a la visceral (20).

Muchas de las enfermedades generadas por especies de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* son problemas de salud pública, lo que motiva a varios países a estudiar la presencia de estos géneros en mamíferos, como en el murciélago, los cuales favorecen el ciclo de transmisión de estos géneros de parásitos (21). Países del Viejo Mundo reportan la presencia de *T. dionisii* y *T. vespertilionis* en especies de las familias Vespertilionidae y Miniopteridae en Africa y Europa (22), mientras que en China no se ha encontrado positividad de *Trypanosoma spp.* en la familia Vespertilionidae, pero sí en Pteropodidae y Rhinolophidae (23). Para *Leishmania* en el Viejo Mundo existen limitados reportes positivos (24–26) entre estos se reporta en Etiopia la presencia de *L. tropica* y *L. major* en *Cardioderma cor* y *Nycteris hispida* respectivamente (27).

Por otra parte, en el Nuevo Mundo, Brasil es el país que más estudios tiene de *Trypanosoma* y *Leishmania*, informando la presencia de *T. cruzi*, *T. c. marinkellei*, *T. rangeli*, y *T. dionisii*, en especies de las familias Phyllostomidae y Vespertilionidae (28–30); y reportan *L. infantum* y *L. braziliensis* en las familias de quirópteros Molossidae, Vespertilionidae, y Phyllostomidae (31–33). Mientras que en Colombia no existen estudios con respecto a especies de *Leishmania* en quirópteros, sí hay de *Trypanosoma*. Como el estudio realizado en Casanare-Colombia, donde detectaron *T. cruzi cruzi*, *T. c. marinkellei*, *T. dionisii*, *T. rangeli*, *T. evansi* y *T. theileri* en murciélagos, informando que la especie que presentaba mayor infección era *Carollia perspicillata* de la localidad de Nunchía (34). En Vichada, también en la Orinoquia colombiana, reportan la presencia de *T. theileri* y *T. wauwau* en dos especies de murciélagos *Molossus molossus* y *Platyrrhinus héller* (9).

En la actualidad, los estudios que identifiquen la co-existencia de ambos géneros en quirópteros son escasos, aunque en Brasil si se ha reportado la coinfección de *Trypanosoma* y *Leishmania*. En Sao Pablo identifican la presencia de *Trypanosoma spp.*, *L. infantum* y *L. amazonensis* en murciélagos, de los cuales solo 2 individuos presentaban ambos géneros (35); mientras que en Maranhao aislaron *T. cruzi marinkellei*, *T. cruzi* y *L. infantum chagasi* en murciélagos, donde solo la especie *Pteronotus parnellii* presentaba infección por *Trypanosoma spp.* y *L. infantum chagasi* (36). En cambio, en Brasilia se estudió la presencia de *T. dionisii*, *T. rangeli*, *T. cruzi* y *Leishmania spp.* en especies de las familias Phyllostomidae y Vespertilionidae (37). Los anteriores informes nos permiten evidenciar el desconocimiento en la coexistencia de ambos géneros de parásitos en los murciélagos, incluida la ausencia de información en Colombia sobre *Leishmania* en estos vertebrados. Además de los resultados negativos o limitados obtenidos por algunos informes en el Nuevo Mundo (38). Identificar la coexistencia de ambos géneros de tripanosomátidos es importante, ya que permitiría conocer sobre las relaciones eco-epidemiológicas que tienen los parásitos con los murciélagos y cómo este afectaría a otros reservorios involucrados en los ciclos de vida de estos kinetoplastidos. Es por esto que, el objetivo de este trabajo es determinar la frecuencia de infección de ambos protozoos por medio de la detección de ADN de *Trypanosoma spp.* y *Leishmania spp.* en murciélagos del departamento de Casanare, Colombia.

## **Materiales y métodos**

### **Área de estudio y muestreo**

La captura de los murciélagos se llevó a cabo en dos periodos del 2019, febrero y septiembre. Se colectaron 172 individuos por medio de redes de niebla, sin discriminar edad o género, Se

realizó en 5 municipios del departamento de Casanare, Colombia (Fig. 1): 18 en Tamará (Cruz Verde: 5°28'55.8"N 72°06'00.7"W), 11 en Maní (Belgrado: 4°48'58.1"N 72°20'15.9"W), 34 en Yopal (La Niata: 5°24'26.2"N 72°18'34.4"W), 51 en Aguazul (Cueva guacharos: 5°12'30.6"N 72°34'34.5"W y La Graciela: 4°52'22.4"N 72°27'35.8"W) y 58 en Pore (San Isidro: 5°39'29.9"N 72°03'12.7"W, Curama: 5°42'11.3"N 72°02'25.2"W y Ramon Nonato: 5°40'03.1"N 72°05'17.9"W). Las redes de niebla se abrieron al atardecer durante cuatro noches, cada noche en una localidad diferente. Luego de la captura, se obtuvo una muestra de sangre por medio de punción cardiaca con una jeringa de insulina de 1ml donde se obtuvo 1000 µl de sangre en EDTA de cada espécimen, y se transfirió a un tampón de guanidina-EDTA para la lisis completa de la sangre y conservación de los fragmentos de ADN. Posterior a la toma de sangre, cada uno de los murciélagos fue liberado en el mismo sitio de captura.

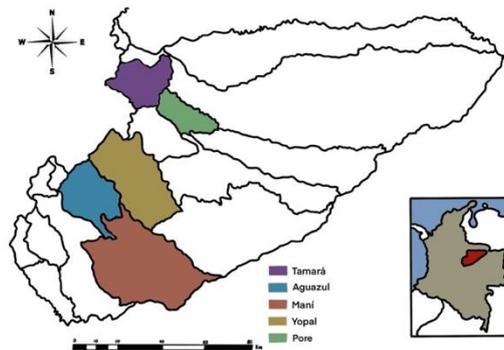


Figura 1. Municipios donde se realizó la toma de la muestra de sangre de los quirópteros.

## Extracción de ADN

Las muestras de sangre de cada espécimen, fueron preservadas en clorhidrato de guanidina 6M y utilizadas para la obtención del ADN. Para este proceso se utilizó el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante con la adición de un spin en el último paso luego de añadir el buffer de elución.

## Amplificación de ADN para detección de tripanosomátidos

### Detección de ADN de *Trypanosoma spp.*

Con el fin de determinar la presencia de *Trypanosoma spp.* en las muestras de sangre de quiróptero, todas las muestras, tanto las obtenidas durante febrero como las tomadas en septiembre se almacenaron y procesaron en conjunto, a estas se les amplificó por medio de una PCR anidada en tubos individuales y en dos montajes independientes. Se amplificó la región variable V1 del gen 18S. Para ello, se utilizó la ADN polimerasa GoTaq Color Less Master Mix (12.5µl) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), ADN (5µl) y los cebadores externos (1.25µl) 5'-CAGAAACGAAACACGGGAG-3' (forward) y (1.25µl) 5'-CCTACTGGGCAGCTTGGA-3' (reverse), y agua para un volumen total de 25 µl. Este par de cebadores amplifica una región de ~ 927 pares de bases (pb) del gen 18S rRNA (28). La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos (min) y 40 ciclos de desnaturalización 94°C por 1 min, anillaje a 58°C por 1 min y extensión a 72°C durante 1 min. Posteriormente, para determinar la eficacia de la reacción, se realizó una electroforesis en geles de agarosa (2%) y se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

Posteriormente, a partir del amplicon obtenido de la reacción anterior, se tomó una alícuota de 5µl de cada reacción para cada muestra de sangre para amplificar una región interna de ~556 pb con los cebadores SSU561F (1.25µl) 5'-TGGGATAACAAAGGAGCA-3' (forward) y SSU561R (1.25µl) 5'-CTGAGACTGTAACCTCAAAGC-3' (reverse) (39,40). La región amplificada por estos cebadores es de ~556 pb. Tanto la mezcla de reactivos como las condiciones de temperatura y ciclos fueron las mismas de la reacción descrita anteriormente. Asimismo, los productos fueron visualizados en geles de agarosa (1.5%) bajo luz UV. Con la evaluación cualitativa de los geles, se consideraron positivas para *Trypanosoma spp.* aquellas reacciones para las cuales se observó una banda de ~ 600 pb en la electroforesis de la PCR anidada. Tanto para la amplificación externa como la interna se utilizó como control positivo ADN de *T. cruzi*, mientras que el negativo fue agua grado molecular.

### **Detección de ADN de *Leishmania spp.***

De manera similar a la detección de *Trypanosoma*, la detección de *Leishmania* se realizó una PCR con el ADN de las muestras de sangre de cada uno de los murciélagos. La mezcla se hizo utilizando la polimerasa GoTaq Green Master Mix (12.5 µl), ADN y los cebadores HSP70F (1.25µl) 5'-AGGTGAAGGCGACGAACG-3' (forward) y HSP70R (1.25µl) 5'-CGCTTGTCATCTTTGCGTC-3' (reverse) agua (5µl), para un volumen total de 25 µl. La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min y 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min, anillaje a 60°C durante 1 min y extensión a 72°C por 1 min. El tamaño de fragmento esperado fue de aproximadamente ~337 pb (41). Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y se visualizaron bajo luz UV. A partir de la evaluación de los resultados, se consideraron positivas para *Leishmania spp.*, aquellas muestras cuando se observó una banda de ~ 300 pb en la electroforesis de la PCR anidada. Los controles positivos fueron cepas de *L. amazonensis*, y *L. panamensis* ; el control negativo fue agua molecular.

### **Identificación de especies de murciélagos**

Para la determinación de especies de murciélagos, únicamente se tomaron las muestras de sangre de aquellos especímenes que habían dado positivo para *Trypanosoma*, *Leishmania*, o las dos en simultáneo. La amplificación se llevó a cabo utilizando los cebadores L1085 5'-CCCAAAGTGGGATTAGATACCC-3' (forward) y H1259 5'-GTTTGCTGAAGATGGCGGTA-3' (reverse) en una reacción de 35 ciclos: desnaturalización a 94°C por 30 segundos (seg), anillaje a 57°C durante 15 seg y extensión a 72°C por 30 seg. Los cebadores usados amplifican un fragmento de 215pb del gen mitocondrial 12S. Posteriormente, los productos de PCR fueron purificados utilizando ExoSAP-IT® para ser enviados para secuenciación de Sanger. Finalmente, las secuencias obtenidas fueron limpiadas con el software SeqMan y los resultados obtenidos fueron contrastados con la base de datos de nucleótidos de NCBI mediante la herramienta Blast (42).

### **Dieta y tipo de hábitat**

Las características propias de los murciélagos tales como la preferencia alimenticia (insectívoro, carnívoro, hematófago, nectarívoro o fructífero) y el hábitat como entornos silvestres (bosques), rurales (pastizales), urbanos (edificios) y urbanos no habitados (casas abandonadas) fueron tomados con base a lo reportado por Brito *et al.*, 2019 (43).

### **Análisis de datos**

Se utilizó el lenguaje de programación R para el manejo de datos. En especial, los paquetes ggplot2 y dplyr fueron usados para la organización de las bases de datos de acuerdo con la dieta y el tipo de hábitat. Posteriormente, teniendo en cuenta que las distintas variables son de carácter categórico, se realizó un Análisis de Correspondencia Múltiple (MCA) de 5 dimensiones, utilizando los paquetes FactoMineR y FactoExtra; para la gráfica se utilizaron las 2 dimensiones que explicaban más del 50% de la variación total de los datos, incluyendo la especie de murciélago, infección por protozoo, ubicación, dieta y hábitat. Finalmente, de las 65 muestras positivas para ambos géneros, se excluyeron dos por falta de información.

## Resultados

De los 172 especímenes, se identificó la especie para aquellos que fueron positivos para uno o ambos géneros de tripanosomátidos. No se identificaron todos los individuos de quirópteros ya la circulación de estos organismos ha sido registrada en estudios previos (5,44). Se identificaron nueve especies de murciélagos, todas pertenecientes al suborden Microchiroptera, las cuales son: *Anoura caudifer*, *Carollia brevicauda*, *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina*, *Myotis spp.*, *Phyllostomus hastatus*, *Sarcopteryx leptura* y *Vampyrum spectrum* (Fig. 1 Anexo). Del total de los individuos recolectados, 36.6% (63/172) resultaron positivos para *Trypanosoma*, 11.6% (20/172) para *Leishmania*, y 10.4% (18/172) para ambos parásitos (Fig. 2).

Los municipios con mayor presencia de organismos infectados para ambos géneros fueron Aguazul y Pore, con 17 individuos positivos cada uno, los negativos correspondían a 34 y 41 respectivamente; seguidos de Yopal con 15 positivos y 19 negativos, luego Tamará con igual número de positivos y negativo (9 casos), finalmente Maní con 5 positivos y 6 negativos.

La especie más abundante que contiene ambos parásitos es *Phyllostomus hastatus* con 66.6% (12/18), seguido de *Myotis spp.* con 22.2% (4/18), y finalmente *Carollia perspicillata* con 11.1% (2/18). Esta última es la que tiene mayor presencia de *Trypanosoma* con 38.09% (24/63). Particularmente dos quirópteros (*Chiroptera*), a los que no se le realizó la identificación de especie, dieron positivo para *Leishmania*.

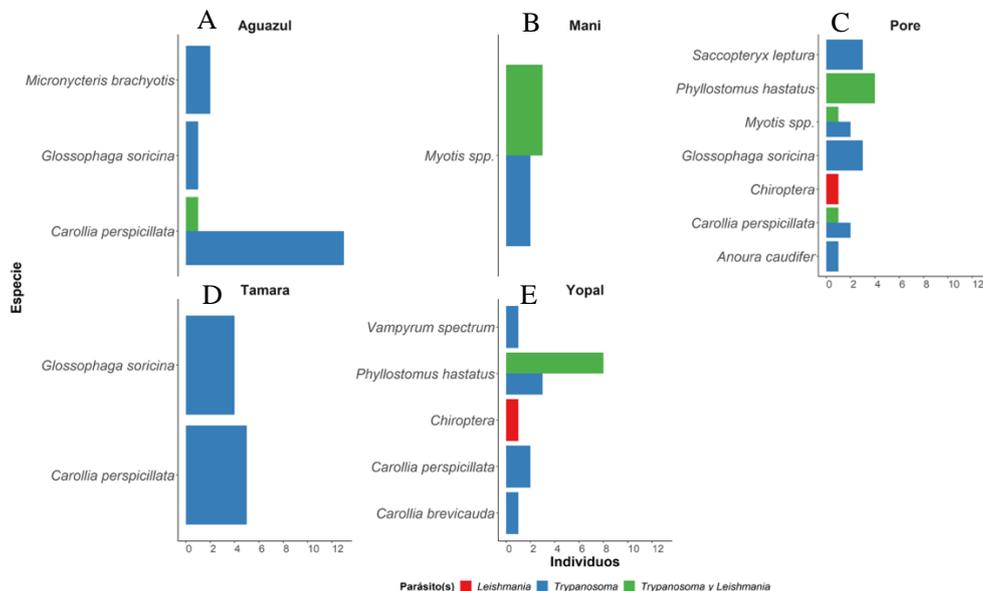
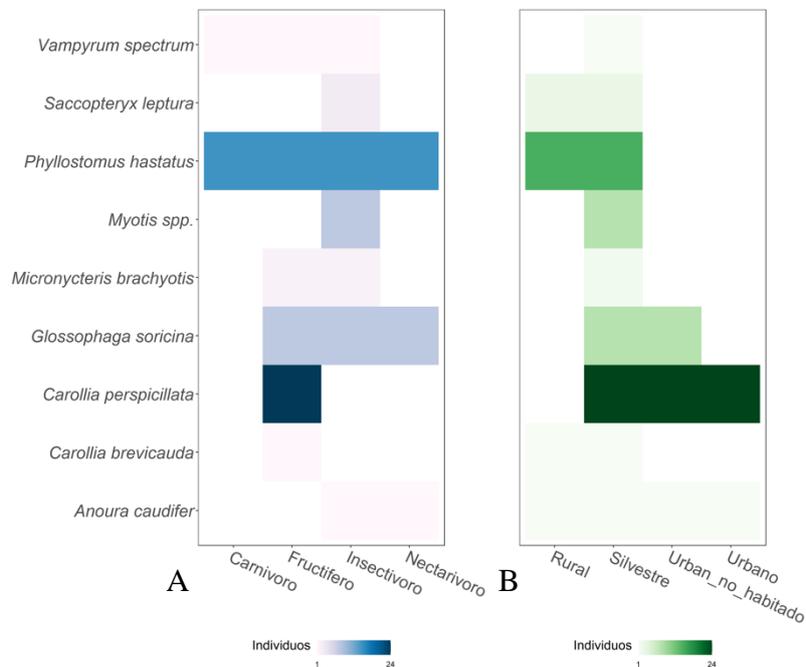


Figura 2. Frecuencia de las especies de murciélagos por municipios infectados por *Trypanosoma* y/o *Leishmania*. A. Aguazul. B. Maní. C. Pore. D. Tamará. E. Yopal.

Las especies colectadas de murciélagos se distribuyen en 3 familias, el 82.5% son de la familia Phyllostomidae, el 15.8% de la familia Vespertilionidae y el 0.63% son de la familia Emballonuridae. Por medio de un análisis bibliográfico se evaluó la preferencia alimenticia y

el hábitat de los quirópteros [43]. Se determinó que los quirópteros positivos para *Trypanosoma* y/o *Leishmania* se clasifican según 4 preferencias alimenticias (carnívoro, insectívoro, fructífero y nectarívoro) [43]. Se observa que la mayoría de las especies son de hábito insectívoro (Fig. 3A), como las especies *Myotis spp.* y *Sarccopteryx leptura*. Por otro lado, la información obtenida reporta que las especies del género *Carollia* son estrictamente fructíferas; la especie *Phyllostomus hastatus* es la única especie que tiene todos los hábitos, compartiendo la dieta carnívora con *Vampyrum spectrum* y la nectarívora con *Anoura caudifer* y *Glossophaga soricina*.

Con respecto al hábitat, todas las especies reportadas se pueden encontrar en entornos silvestres, como bosques secundarios y primarios (Fig. 3B) [43], algunas como *Vampyrum spectrum*, *Myotis spp.* y *Micronycteris brachyotis* habitan solamente en este; mientras que *Anoura caudifer* puede ser encontrada en todos los hábitats. *Carollia perspicillata* por su parte, puede ser vista en entornos urbanos o urbanos no habitados, tales como edificios abandonados, este último es compartido con *Glossophaga soricina*. *Carollia brevicauda*, *Phyllostomus hastatus* y *Sarccopteryx leptura* se pueden ver en áreas rurales (Fig. 3B).



**Figura 3. Preferencias en la dieta y hábitat de las especies de murciélagos positivas para ambos parásitos. A.** Dieta de los quirópteros (carnívoro, fructífero, nectarívoro e insectívoro). **B.** Preferencia en el hábitat (silvestre, rural, urbano y urbano no habitado)

En el MCA se obtuvo 5 dimensiones, de las cuales se seleccionaron las 2 que mejor representan los datos, la primera dimensión con 33.2% y la segunda con 17,5% (Fig. 4), evidenciando que la presencia de *Trypanosoma* y *Leishmania* se encuentra mayoritariamente en la especie *Phyllostomus hastatus*, además se evidencia que la presencia de uno o ambos parásitos no es un diferencial entre los quirópteros. Por otro lado, no se tuvo en cuenta para el MCA las especies infectadas únicamente por *Leishmania* por falta de información, ya que no se contaba con la identificación de la especie.

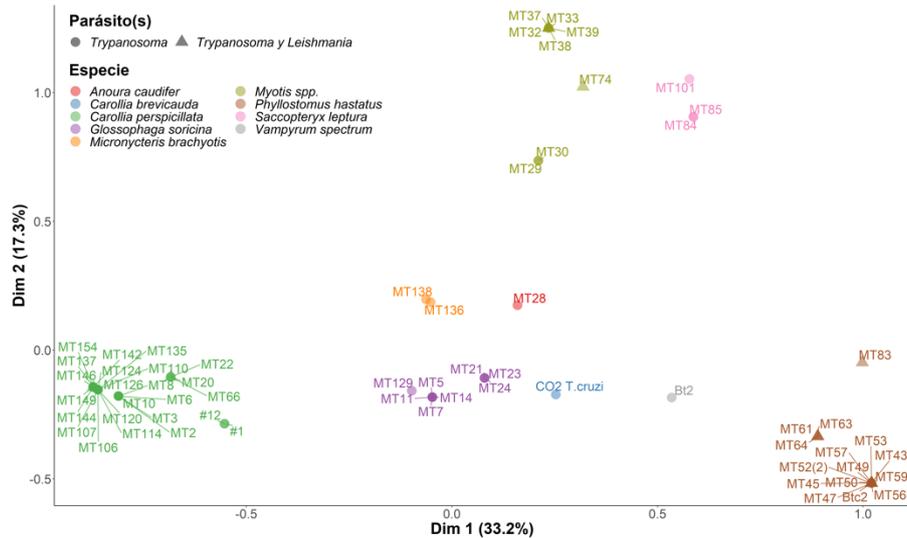


Figura 4. MCA de las especies de murciélagos con *Trypanosoma spp.* o *Trypanosoma spp.* y *Leishmania*

## Discusión

El número de artículos que han estudiado la coinfección de *Leishmania* y *Trypanosoma* en murciélagos es escaso. No obstante, la detección de estos protozoos en quirópteros es importante porque estos últimos facilitan la transmisión de enfermedades generadas por especies de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* a otros vertebrados, incluido el humano [2]. Esta capacidad de facilitar la dispersión de *Trypanosoma* y *Leishmania* por parte de los murciélagos es debido a sus interacciones interespecíficas con artrópodos transmisores de los parásitos, además de la habilidad de colonizar nuevos nichos, tanto silvestres como intervenidos (Fig. 3B) (9,35,37).

En el presente estudio se reporta la coinfección de *Leishmania spp.* y *Trypanosoma spp.* en 18 individuos de tres especies diferentes de murciélagos, *Phyllostomus hastatus*, *Myotis spp.* y *Carollia perspicillata*; siendo la primera vez que se identifica infección simultánea en quirópteros colombianos. Esto mismo es reportado en Brasil, en donde se ha encontrado, en trabajos independientes, la coinfección de *Trypanosoma* y *Leishmania* en 21 individuos de las familias Molossidae, Noctilionidae, Mormoopidae, Phyllostomidae y Vespertilionidae (35–37,45). En términos de frecuencia de infección, el actual trabajo presenta una mayor frecuencia, de 10.4% comparado con algunos de los obtenidos en Brasil, donde 0.04% y 0.14% fueron en Sao Pablo (35,45) 0.86% en Maranhao (36) y 12.32% en Brasilia (37). Esto puede ser explicado por las diferencias en el esfuerzo de muestreo y las técnicas de detección, ya que algunos estudios usan pruebas serológicas como la identificación de anticuerpos por medio de inmunofluorescencia (IFAT) y/o PCR de la región V7-V8 para reconocer *Trypanosoma* y *Leishmania*. Para pruebas serológicas se ha demostrado que existe la posibilidad de reacciones cruzadas con otros patógenos que alterarían los resultados (46), esto sumado a la escasa variabilidad que tiene la región V7-V8 (47). Con el fin de evitar estos posibles errores, el actual trabajo identificó *Trypanosoma* por medio de la región variante V1 del gen 18S (39,40) y el uso HSP70 para establecer infección por *Leishmania*, teniendo en cuenta su elevada sensibilidad para identificar este género de parásitos (41).

Las especies de quirópteros fueron identificadas por medio del gen mitocondrial 12S, el cual es ampliamente usado para identificar vertebrados y tiene una buena resolución comparado con otros métodos de identificación como por morfología (48,49). De estas especies de murciélagos

aquí reportadas, únicamente tres presentaban ambos géneros de tripanosomátidos. no hay reportes de coinfección en estas especies de murciélagos en América, sí se ha evidenciado la presencia de estos kinetoplástidos por separado en individuos diferentes de las mismas especies. En particular, *L. infantum* (32,50), *T. cruzi* (36) y *T. rangeli* (35) han sido aisladas en individuos de las especies *Phyllostomus hastatus*, *Myotis spp.* y *Carollia perspicillata*. La infección en estas especies de murciélago posiblemente es producto de sus preferencias alimenticias y el tipo de hábitat que ocupan (Figura 3A-3B).

De acuerdo a lo anterior, la co-infección en murciélagos con los dos protozoos se puede deber a su co-existencia con artrópodos hematófagos, tales como las moscas del género *Phlebotomus* (51–53) y las garrapatas ectoparásitas de la familia Ixodidae (54–56), las cuales tienen la capacidad de transmitir ambos protozoos. La transmisión de *Trypanosoma* ha sido ampliamente estudiada en triatominos de la familia Reduviidae (57–61), como *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius pallescens*, a los cuales se les ha encontrado entre sus preferencias alimenticias, los murciélagos (62). Los anteriores triatominos fueron encontrados en áreas selváticas y domésticas, lo cual concuerda con los resultados aquí mostrados, donde los quiropteros se han presentado en zonas silvestres e intervenidas (Fig. 3B). Tampoco se descarta que la infección por *Trypanosoma* sea consecuencia del consumo de organismos infectados (9,34), transmisión congénita (63) o salivar (64). Por otra parte, para la transmisión por parte de *Leishmania* se ha reportado que la especie *Lutzomyia longipalpis* se alimenta a base de distintos mamíferos, entre los que están los murciélagos (65,66).

A pesar de que sólo tres de las nueve especies de murciélagos evaluadas en el presente estudio, resultaron positivas para ambos géneros, cabe resaltar que algunas de las restantes seis, como *Glossophaga soricina* y *Carollia brevicauda*, ya habían sido reportadas como hospederos de *Trypanosoma* en la Orinoquia colombiana. Más específicamente, en el actual estudio se reporta una tasa de infección de tripanosomátidos del 36.6% para Casanare. En comparación, en un estudio previo hecho en el mismo departamento se reportó un 61% de prevalencia, correspondiente a infecciones por *T. cruzi cruzi*, *T. c. marinkellei*, *T. dionisii*, *T. rangeli*, *T. evansi* y *T. theileri* (34). Además, las infecciones de *T. cruzi* se han registrado con una frecuencia del 22.58% en La Candelaria y 11.11% en Los Potrillos (67). Finalmente, la tasa más alta registrada en la región de la Orinoquia, fue medida en Vichada con el 66.7% de individuos quirópteros infectados con *T. theileri* y/o *T. wauwau* (9). Diferencias en los resultados pueden ser consecuencia por el tamaño de la muestra y esfuerzo de muestreo realizados en cada estudio, además de la sensibilidad de las pruebas moleculares, ya que a diferencia de los anteriores estudios, el presente estudio realiza PCR anidada de la región variable V1 del gen 18S para la identificación de *Trypanosoma* (39,40).

El hallazgo de murciélagos infectados con *Leishmania* en Casanare es atípico, ya que este departamento no es una región endémica para enfermedades causadas por este género de protozoo. Estudios similares hechos en Brasil reportan la presencia de *Leishmania* en murciélagos provenientes de regiones no endémicas de esta enfermedad, como en el estado Minas Gerais donde la frecuencia fue de 8%, similar al 11.6% obtenido en el presente estudio (Fig. 2) (33). Esta diferencia puede ser ocasionada por el tamaño de la muestra y la abundancia de estos reservorios (9,10), ya que de las 20 especies de murciélagos brasileños solo coinciden tres, una de las cuales son *P. hastatus* (8.8%) positiva para *Leishmania spp.*

De acuerdo a lo anterior, no se puede descartar la presencia de *Leishmania* en las otras especies de quirópteros reportados, ya que anteriormente ha sido reportado que el tipo de muestra utilizada juega un papel muy importante en la detección del parásito por medio de la prueba de

PCR. En especial, se ha visto que las muestras de sangre presentan baja sensibilidad, en comparación a muestras de otros órganos como bazo, hígado o piel, (32,33). Los anteriores son más invasivos que la punción cardíaca y requieren que los quirópteros sean sacrificados (45). Aunque en estudios previos se ha evidenciado que fragmentos de alas e hisopos orales han resultado en una tasa de positividad más alta que en muestras de sangre de los mismos individuos (37). Esto puede ser una de las causas de porqué no se encontró leishmaniasis en especies como *Glossophaga soricina*, a pesar de que *L. braziliensis*, *L. amazonensis* (33) y *L. infantum* (45) han sido identificados en esta especie en Brasil.

Profundizando lo anterior, es posible que los 20 individuos que presentaron ADN de *Leishmania*, correspondientes al 11.6 % del total, hayan podido infectarse de manera natural, tal como ha sido evidenciado en varios estudios, lo cual sugiere que los quirópteros juegan un rol epidemiológico muy importante en el ciclo de transmisión de la leishmaniasis (32,33,45). De igual forma, los resultados obtenidos en el MCA (Fig. 4) soportan publicaciones hechas por otros autores en donde se afirma que la infección por *Leishmania* no se ve favorecida por los hábitos alimenticios de los murciélagos, aun cuando las especies encontradas tengan hábitos insectívoros (33).

Los hallazgos de co-infección de 10.4% en este trabajo refuerzan declaraciones anteriores que muestran el importante papel que juegan las especies de murciélagos en la transmisión de *Trypanosoma* y *Leishmania*, ya que se encontró infección por *Leishmania* en una región donde se demuestra su reciente incremento en casos de leishmaniasis según reportes del Instituto Nacional de Salud en el 2018 (68). Esto sumado a que la leishmaniasis afecta a distintos vertebrados, encontrándose principalmente leishmaniasis visceral y cutánea en humanos y perros, transmitidas por *Lu. longipalpis* y *Lu. evansi* (69). Por otro parte, se corroboran estudios anteriores de tripanosomiasis en murciélagos de Casanare, que confirman la presencia de esta enfermedad en este departamento. Lo anterior es importante ya que adicional a la enfermedad de Chagas en humanos, se encuentran otras enfermedades generadas por *Trypanosoma*, algunas como *T. evansi*, afectan al ganado provocando problemas económicos (70) u otras también generan nagara en diferentes animales domésticos (71). Finalmente, para futuros análisis, es importante tener en cuenta el papel de los murciélagos en el circuito eco-epidemiológico de los parásitos, además de identificar las especies de *Trypanosoma* y *Leishmania* por medio de Deep sequencing.

## Conclusión

El presente estudio utiliza técnicas moleculares para la identificación de *Trypanosoma* y *Leishmania* en murciélagos, siendo el primero en describir la presencia de ambos protozoos en quirópteros en Colombia. Este trabajo refuerza estudios anteriores de infección de tripanosomátidos en quirópteros, corroborando el potencial papel que cumplen en la transmisión de enfermedades endémicas y no endémicas en el país. Lo anterior presenta importantes implicaciones epidemiológicas especialmente para la tripanosomiasis y leishmaniasis en diferentes vertebrados, teniendo en cuenta que es el primer reporte de *Leishmania* en murciélagos del Neotrópico en la Orinoquía, región donde esta enfermedad no es endémica.

## Agradecimientos

Agradecemos a la Dirección de Investigación e Innovación de la Universidad del Rosario.

## Bibliografía

1. Eick G, Jacobs D, and CM-MB, 2005 undefined. A nuclear DNA phylogenetic perspective on the evolution of echolocation and historical biogeography of extant bats (Chiroptera). *academic.oup.com* [Internet]. [cited 2021 Jan 19]; Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article-abstract/22/9/1869/982122>
2. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes K V, Schountz T. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2006 [cited 2021 Jan 19];19(3):531–45. Available from: <http://cmr.asm.org/>
3. Mickleburgh SP, Hutson AM, Racey PA. A review of the global conservation status of bats. *Oryx* [Internet]. 2021 [cited 2021 Jan 19];36(1). Available from: <https://www.cambridge.org/core/terms>.
4. Rodríguez-Mahecha J, Alberico M, Trujillo F. Libro rojo de los mamíferos de Colombia. 2006 [cited 2021 Jan 19]; Available from: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=UNIBA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=003009>
5. Han ES, goleman, daniel; boyatzis, Richard; Mckee A. Mamíferos (Synapsida: Theria) de Colombia. Vol. 53, Insituto Alexander von Humbolt. 2000.
6. Schmidt-French B, Butler C. Do bats drink blood?: fascinating answers to questions about bats. 2009 [cited 2021 Jan 19]; Available from: <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=wrKTDgyT3PMC&oi=fnd&pg=PR9&dq=Do+bats+drink+blood%3F:fascinating+answers+to+questions+about+bats&ots=L6wYIMchDC&sig=7B4fvF3YWj1Vwy8YAYU2j9vYvf8>
7. Garcia Rivera L, Mancina CA. Murciélagos Insectívoros National survey and Conservation Action Plan of Cuban bats View project Establishing a baseline to design wildlife corridors in Cuban mountain ecosystems View project [Internet]. 2011 [cited 2021 Jan 20]. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/285054010>
8. Hoare C.A. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. *cabdirect.org* [Internet]. 1972 [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19722902365>
9. Jaimes-Dueñez J, ... OC-B-PV, 2020 undefined. Molecular surveillance reveals bats from eastern Colombia infected with *Trypanosoma theileri* and *Trypanosoma wauwau*-like parasites. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 19]; Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587720308436?casa\\_token=nATbtT9IdWIAAAAA:C0SBpa5Ma0fl4SjJRbOayh8GRoLzUeRaIyAs6-uKcMAe2MGCWHDc60WDAite3-v4OSq\\_w1qRrga8](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587720308436?casa_token=nATbtT9IdWIAAAAA:C0SBpa5Ma0fl4SjJRbOayh8GRoLzUeRaIyAs6-uKcMAe2MGCWHDc60WDAite3-v4OSq_w1qRrga8)
10. Stevens VJ, Obarzanek E, Cook NR, Lee IM, Appel LJ, West DS, et al. Long-term weight loss and changes in blood pressure: Results of the trials of hypertension prevention, phase II. *Ann Intern Med*. 2001 Jan 2;134(1):1–11.
11. Hamilton P, Gibson W, and JS-M phylogenetics, 2007 undefined. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 19]; Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790307000905?casa\\_token=3wk30eBCUNMAAAAA:Z\\_nqpsH-YfVAwLAIJr74PmjLXU3LvWZ6kJQpb0jR-](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790307000905?casa_token=3wk30eBCUNMAAAAA:Z_nqpsH-YfVAwLAIJr74PmjLXU3LvWZ6kJQpb0jR-)

- L\_RX9MPS7P3gCCIDFGtZCIefX5ues1wRQMp
12. Hamilton P, Stevens J, Gidley J, ... PH-I journal for, 2005 undefined. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 19]; Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751905000020?casa\\_token=bDcvr6Ycvd0AAAAA:TI6qa5uguQKpB-yI6FusDc\\_w6WxA0DBe-eUNjvYgxIsxeeRYmjMHF-KVR4HvFgDRwlFygtLx85GV](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751905000020?casa_token=bDcvr6Ycvd0AAAAA:TI6qa5uguQKpB-yI6FusDc_w6WxA0DBe-eUNjvYgxIsxeeRYmjMHF-KVR4HvFgDRwlFygtLx85GV)
  13. Telleria J, Tibayrenc M. American trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research. 2017 [cited 2021 Jan 19]; Available from: <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=XEHQDAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=American+trypanosomiasis+Chagas+disease:+one+hundred+years+of+research&ots=Zbm5863RoA&sig=qdxV2wAth-N4TvIc1QZqCxlEIM>
  14. WHO. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire [Internet]. [cited 2021 Jan 20]. Available from: <http://www.who.int/wer>
  15. WHO. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis) [Internet]. WHO. [cited 2021 Jan 20]. Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
  16. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Elsevier [Internet]. 2000 [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751900001363>
  17. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Elsevier [Internet]. 2004 [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147957104000232>
  18. Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of Leishmania. researchonline.lshtm.ac.uk [Internet]. 2010 [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://researchonline.lshtm.ac.uk/id/eprint/986/>
  19. Salgado-Almario J, Hernández C, Biomédica CO-B-, 2019 undefined. Geographical distribution of Leishmania species in Colombia, 1985-2017. scielo.org.co [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-41572019000200278&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-41572019000200278&script=sci_arttext&tlng=en)
  20. Instituto Nacional de Salud. Boletín epidemiológico semanal Numero 52 [Internet]. [cited 2021 Jan 20]. Available from: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2016 Boletín epidemiológico semana 51.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2016%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2051.pdf)
  21. Hamilton P, Teixeira M, parasitology JS-T in, 2012 undefined. The evolution of Trypanosoma cruzi: the 'bat seeding' hypothesis. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492212000189?casa\\_token=m2zWH5Bg8IYAAAAA:LLC9ewe05qwwzqOMJgxDWYOX7CA865IngJI0myQ4QcLEVvYCmsqyOsHzSb9ISKy87ylkXSwspXVIP](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492212000189?casa_token=m2zWH5Bg8IYAAAAA:LLC9ewe05qwwzqOMJgxDWYOX7CA865IngJI0myQ4QcLEVvYCmsqyOsHzSb9ISKy87ylkXSwspXVIP)
  22. Clément L, Dietrich M, Markotter W, ... NF-MP, 2020 undefined. Out of Africa: the origins of the protozoan blood parasites of the Trypanosoma cruzi clade found in bats from Africa. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790319305858?casa\\_token=VKzhFKJxoVsAAAAA:4EUENf93xZbYYIxnY8jfvMYYXZaAULUGqk2KovWZrs06nXQ9dueoLBs7HP5Di4Fz5z0EHmqOkNqkM](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790319305858?casa_token=VKzhFKJxoVsAAAAA:4EUENf93xZbYYIxnY8jfvMYYXZaAULUGqk2KovWZrs06nXQ9dueoLBs7HP5Di4Fz5z0EHmqOkNqkM)
  23. Cai Y, Wang X, Zhang N, Li J, Gong P, He B, et al. First report of the prevalence and genotype of Trypanosoma spp. in bats in Yunnan Province, Southwestern China. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X19303869?casa\\_token=](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X19303869?casa_token=)

- X3ni8USz8kkAAAAA:LK2b9jVzl4YIIPUj3FBcLfDbu7cNnj0ACtNs9tj1\_YLnQk5S5qBwCIVzILAjqePJfoHXgD5sBvtj
24. Millán J, López-Roig M, Cabezón O, Serra-Cobo J. Absence of *Leishmania infantum* in cave bats in an endemic area in Spain. *Parasitol Res.* 2014;113(5):1993–5.
  25. Rajendran P, Chatterjee SN, Dhanda V, Dhiman RC. Observations on the role of vespertilionid bats in relation to non-human vertebrate reservoir in Indian kala-azar. *Indian J Pathol Microbiol.* 1985;28(2):153–8.
  26. Journal MM-EAM, 1975 undefined. The animal reservoir of cutaneous leishmaniasis on Mount Elgon, Kenya. *cabdirect.org* [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19752902695>
  27. Kassahun A, Sadlova J, Benda P, tropica TK-A, 2015 undefined. Natural infection of bats with *Leishmania* in Ethiopia. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X15300723>
  28. 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 Jul 20;11(7).
  29. Helena J, Barros S, Luiz A, Roque R, Cristina S, Xavier C, et al. Biological and Genetic Heterogeneity in *Trypanosoma dionisii* Isolates from Hematophagous and Insectivorous Bats. *mdpi.com* [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [www.mdpi.com/journal/pathogens](http://www.mdpi.com/journal/pathogens)
  30. McClean MCW, Bhattacharyya T, Mertens P, Murphy N, Gilleman Q, Gustin Y, et al. A lineage-specific rapid diagnostic test (Chagas Sero K-SeT) identifies Brazilian *trypanosoma cruzi* II/V/VI reservoir hosts among diverse mammalian orders. *PLoS One.* 2020 Jan 1;15(1).
  31. Shapiro J, Junior M, tropica MD-A, 2013 undefined. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X13001848?casa\\_token=BygOqMqJfIIAAAAA:CbMIutaf\\_9sw-\\_mmxyIYfv8NnSgfgfLA9alCUFTI6kHTqRVX8nkITHcU9tN0Grd-FBpVCUWPjtbz](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X13001848?casa_token=BygOqMqJfIIAAAAA:CbMIutaf_9sw-_mmxyIYfv8NnSgfgfLA9alCUFTI6kHTqRVX8nkITHcU9tN0Grd-FBpVCUWPjtbz)
  32. Castro L, Dorval M, ... LM-IJ for, 2020 undefined. *Leishmania* presence in bats in areas endemic for leishmaniasis in central-west Brazil. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213224420300201>
  33. Gomez-Hernandez C, Bento E, Parasitology KR-O-, 2017 undefined. *Leishmania* infection in bats from a non-endemic region of Leishmaniasis in Brazil. *cambridge.org* [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/leishmania-infection-in-bats-from-a-nonendemic-region-of-leishmaniasis-in-brazil/BD67E7DF38B051C44457A93BA9FA8596>
  34. Ramírez JD, 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;
  35. Oliveira F de, Costa L, Barros T de, tropica PI-A, 2015 undefined. First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban areas. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X15300590?casa\\_token=n3ODyJMB8i0AAAAA:shKB\\_OPvUiuf9dLeel5P2kKJarC4S5b40PzzYsVTeZWkr2GpOdBocZnMo\\_WQwjO5V\\_4Eoc3jg1A9](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X15300590?casa_token=n3ODyJMB8i0AAAAA:shKB_OPvUiuf9dLeel5P2kKJarC4S5b40PzzYsVTeZWkr2GpOdBocZnMo_WQwjO5V_4Eoc3jg1A9)
  36. Pereira A, Costa D, Borges Costa F, Ramirez D. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*

- infantum chagasi Infection in Wild Mammals from Maranhão State, Brazil. *liebertpub.com* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2021 Jan 20];15(11):656–66. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/283260451>
37. Lourenco J, Minuzzi-Souza T, Tropica LS-A, 2018 undefined. High frequency of trypanosomatids in gallery forest bats of a Neotropical savanna. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X17302991>
  38. Rotureau B, Catzeflis F, hygiene BC of tropical medicine and, 2006 undefined. Absence of leishmania in Guianan bats. *ASTMH* [Internet]. 2006 [cited 2021 Jan 20];74(2):318–21. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/7302770>
  39. Smith A, Clark P, Averis S, Lymbery AJ, Wayne AF, Morris KD, et al. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed bettong *Bettongia penicillata* (Marsupialia : Potoroidae). *researchrepository.murdoch.edu.au* [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://researchrepository.murdoch.edu.au/id/eprint/2109/>
  40. Noyes H, Stevens J, Teixeira M, ... JP-IJ for, 1999 undefined. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia1. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751998001672>
  41. Hernández C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez JD. Identification of Six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites and Vectors*. 2014;7(1).
  42. Madden T. The BLAST sequence analysis tool. *ncbi.nlm.nih.gov* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK153387>
  43. Brito J, Camacho MA., Romero V., Vallejo AF. *Mamíferos de Ecuador* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jan 20]. Available from: <https://bioweb.bio/faunaweb/mammaliaweb/Citar/>
  44. Saulo J, Oviedo U, Trujillo González F, De DD. identificación de ecosistemas estratégicos.
  45. Savani E, ... M de A-V, 2010 undefined. Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in Brazilian bats. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709006682?casa\\_token=RKNFt\\_0mNXoAAAAA:ZyZXiJnDWBAE5mkeEJD\\_mIlEcMEC1F6hfK9XdBv5rLrgx3KMaTuOMkErBgRSBWcrhheswPmh1\\_PGO](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709006682?casa_token=RKNFt_0mNXoAAAAA:ZyZXiJnDWBAE5mkeEJD_mIlEcMEC1F6hfK9XdBv5rLrgx3KMaTuOMkErBgRSBWcrhheswPmh1_PGO)
  46. Savani ESMM, Galati EAB, Camargo MCGO, D’Auria SRN, Damaceno JT, Balduino SA. Serological survey for American cutaneous leishmaniasis in stray dogs in the S. Paulo State, Brazil. *Rev Saude Publica* [Internet]. 1999 [cited 2021 Jan 20];33(6):629–31. Available from: [www.fsp.usp.br/rsp](http://www.fsp.usp.br/rsp)
  47. Jr MC, Marcili A, Lima L, ... F da S-I journal for, 2010 undefined. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (*ssrRNA* and *gGAPDH*) and mitochondrial (*Cyt b*) genes of trypanosomes of the. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751909003701?casa\\_token=Cb95SLfQVQoAAAAA:jFAXzEQp9EIOPVU808HRFBBv0Yee6-X56ZBxKg2AoOIqVp\\_ToCnzCdgL5n7XM8Xa7tJavcl5EB-p](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751909003701?casa_token=Cb95SLfQVQoAAAAA:jFAXzEQp9EIOPVU808HRFBBv0Yee6-X56ZBxKg2AoOIqVp_ToCnzCdgL5n7XM8Xa7tJavcl5EB-p)
  48. Grattarola LF. Aportes de la ecología molecular al estudio de mamíferos en Uruguay.
  49. Kitano T, Umetsu K, Tian W, Osawa M. Two universal primer sets for species identification among vertebrates. *Int J Legal Med* [Internet]. 2007 Sep 21 [cited 2021

- Jan 21];121(5):423–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00414-006-0113-y>
50. Lima H, Rodríguez N, Barrios M, ... ÁÁ-M do I, 2008 undefined. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *SciELO Bras* [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762008000400018&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762008000400018&script=sci_arttext)
  51. Calzolari M, Rugna G, Clementi E, Carra E, Pinna M, Bergamini F, et al. Research Article. *hindawi.com* [Internet]. 2018 [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/2597074>
  52. Svobodová M, Alten B, Zídková L, ... VD-I journal for, 2009 undefined. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751908002701?casa\\_token=g09K0Ha7\\_SEAAAAA:4UKLTJ\\_TFpA73LrC36-IZQ0nx9UxAbXwOr6Lb5HySn9DGtiUVcaCAwz4QxRIkE2zKO8aMN7KY8R](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751908002701?casa_token=g09K0Ha7_SEAAAAA:4UKLTJ_TFpA73LrC36-IZQ0nx9UxAbXwOr6Lb5HySn9DGtiUVcaCAwz4QxRIkE2zKO8aMN7KY8R)
  53. McConnell E, *Parasitology MC-TJ of*, 1964 undefined. Trypanosomes and other microorganisms from Panamanian *Phlebotomus* sandflies. *JSTOR* [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://www.jstor.org/stable/3275613>
  54. Dantas-Torres F. Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites and Vectors*. 2008;1(1).
  55. Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, De Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitol Res*. 2010 Mar;106(4):857–60.
  56. de Almeida RFC, Garcia MV, Cunha RC, Matias J, e Silva EA, de Fatima Cepa Matos M, et al. Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: First report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. *Exp Appl Acarol*. 2013;60(1):63–72.
  57. Dias E, Mello G, Costa O, Damasceno R. Investigações sôbre esquistripanose de morcegos no Estado do Pará: encontro do barbeiro cavernicola pilosa como transmissor (Publicado originalmente em 1942) [Internet]. 2001 [cited 2021 Jan 20]. Available from: <https://patua.iec.gov.br/handle/iec/3341>
  58. Oliveira M, Ferreira R, Carneiro M, *Ecotropica LD-*, 2008 undefined. Ecology of *Cavernicola pilosa* Barber, 1937 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the Boa Esperança Cave, Tocantins, Brazil. *academia.edu* [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [https://www.academia.edu/download/37306312/Oliveira\\_et\\_al\\_-\\_Ecotropica\\_2008.pdf](https://www.academia.edu/download/37306312/Oliveira_et_al_-_Ecotropica_2008.pdf)
  59. *Medicine CM-T of the RS of T*, 1966 undefined. Observations on human, monkey and bat trypanosomes and their vectors in Colombia. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0035920366901921>
  60. Abad-Franch F, Lima M, *tropica OS-A*, 2015 undefined. On palms, bugs, and Chagas disease in the Americas. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X15300528?casa\\_token=haxfDUeMzVgAAAAA:-WYvKP9ZcaWzta1ZhuEkd0gre48CW4Fhx10GtaTLDWKBzRqoe\\_xcGOPvFeOYHeZWFRHwJ7DoBlnX](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X15300528?casa_token=haxfDUeMzVgAAAAA:-WYvKP9ZcaWzta1ZhuEkd0gre48CW4Fhx10GtaTLDWKBzRqoe_xcGOPvFeOYHeZWFRHwJ7DoBlnX)
  61. Vallejo G, Guhl F, *tropica GS-A*, 2009 undefined. Triatominae–*Trypanosoma cruzi*/T. rangeli: Vector–parasite interactions. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X08002714?casa\\_token=d](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X08002714?casa_token=d)

- A2GRwdv\_KoAAAAA:\_B485i3XQV1QRhL-9988haF81fcHtIzYl45OFwTsdccuJrsd0dLA8tmE64cPtXi-jc1I7uxCqLGs
62. Hernández C, Salazar C, Brochero H, Teherán A, Buitrago LS, Vera M, et al. Untangling the transmission dynamics of primary and secondary vectors of *Trypanosoma cruzi* in Colombia: Parasite infection, feeding sources and discrete typing units. *Parasites and Vectors*. 2016 Jan 12;9(1).
  63. Añez N, Crisante G, tropica PS-A, 2009 undefined. *Trypanosoma cruzi* congenital transmission in wild bats. Elsevier [Internet]. [cited 2021 Jan 20]; Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X08002180?casa\\_token=paNK4-oVPWQAAAAA:UFACGO4IL57\\_D4LQRB1PsVbxEixs1OkBHmkkkgUMCunb7GhQvdqzxOTm1BtsJwQU1X80mn0jUkJJo5](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X08002180?casa_token=paNK4-oVPWQAAAAA:UFACGO4IL57_D4LQRB1PsVbxEixs1OkBHmkkkgUMCunb7GhQvdqzxOTm1BtsJwQU1X80mn0jUkJJo5)
  64. 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.
  65. Dias F de OP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Blood feeding sources and peridomiciliation of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cad saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Esc Nac Saúde Pública* [Internet]. 2003 [cited 2021 Jan 20];19(5):1373–80. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2003000500015&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2003000500015&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)
  66. Lampo M, Feliciangeli MD, Márquez LM, Bastidas C, Lau P. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (diptera: psychodidae). *Am J Trop Med Hyg*. 2000;62(6):718–9.
  67. Erazo D, González C, Guhl F, Umaña JD, Morales-Betancourt JA, Cordovez J. *Rhodnius prolixus* colonization and *Trypanosoma cruzi* transmission in oil palm (*Elaeis guineensis*) plantations in the Orinoco Basin, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2020 Jul 1;103(1):428–36.
  68. Da I, Acosta CL, Da Costa AP, Gennari SM, Marcili A. Survey of *Trypanosoma* and *Leishmania* in Wild and Domestic Animals in an Atlantic Rainforest Fragment and Surroundings in the State of Espírito Santo, Brazil. *J Med Entomol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jan 20];51(3):686–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1603/ME13177>
  69. Romero-Peñuela MH, Alberto Sánchez-Valencia J. El diagnóstico de la leishmaniasis visceral canina (*Leishmania infantum*) [Internet]. 190.15.17.25. [cited 2021 Jan 20]. Available from: <http://190.15.17.25/vetzootec/downloads/v1n1a08.pdf>
  70. Lun ZR, Allingham R, Brun R, Lanham SM. The isoenzyme characteristics of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* isolated from domestic stocks in China. *Ann Trop Med Parasitol*. 1992;86(4):333–40.
  71. Rojas A. *Desmodus rotundus* (Chiroptera: Phyllostomidae) como Vector y Reservorio de *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma equiperdum* en América Latina [Internet]. [www.revistas.veterinariosvs.org](http://www.revistas.veterinariosvs.org). [cited 2021 Jan 20]. Available from: <http://www.revistas.veterinariosvs.org/index.php/ravvs/article/download/223/229>