

**UNIVERSIDAD NACIONAL**  
**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**  
**POSTGRADO EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES**



**Murciélagos generalistas de Costa Rica: descripción de aspectos macroambientales en sitios de captura, características de hospedero y caracterización molecular de hemoflagelados de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp.**

**SUSTENTANTE**  
**RANDALL RUBÍ CHACÓN**  
**“CAMPUS BENJAMÍN NUÑEZ”**  
**HEREDIA**  
**Mayo 2017**

Tesis sometida a consideración del tribunal Examinador del Postgrado en Ciencias Veterinarias Tropicales para aspirar por el grado a académico de *Magister Scientiae* en Medicina de la Conservación con Énfasis en Salud Ecosistémica.

**Murciélagos generalistas de Costa Rica: descripción de aspectos macroambientales en sitios de captura, características de hospedero y caracterización molecular de hemoflagelados de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp.**

SUSTENTANTE:  
RANDALL RUBI CHACÓN

Tesis presentada para aspirar al grado académico de *Magister Scientiae* en Medicina de la Conservación con Énfasis en Salud Ecosistémica.

Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Postgrado de la Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica

## **I. Miembros del Tribunal Examinador**

---

Ph.D. Francisco San Lee Campos  
Representante Presidencia del Consejo Central de Postgrado

---

Ph.D. Kindle Blanco Peña  
Representante del PCVET

---

M.Sc. Andrea Urbina Villalobos  
Tutora

---

Ph.D. Gaby Dolz  
Lectora

---

Ph.D. Marco V. Herrero Acosta.  
Lector

---

Randall Rubí Chacón  
Sustentante

## II. Resumen

Los murciélagos son un grupo de mamíferos con gran diversidad, que juegan un papel muy importante en los procesos ecológicos de los bosques tropicales. A pesar de ello, actualmente se encuentran amenazados por la fragmentación, la degradación del hábitat, la desinformación y el uso de pesticidas; que causan cambios en la oferta alimenticia afectando la dinámica de las comunidades de estos quirópteros.

Históricamente han sido asociados con una serie de agentes infecciosos como virus, bacterias y hongos, así como agentes parasitarios. Dentro de las investigaciones realizadas en parásitos, destacan las realizadas en los hemoflagelados de la familia Trypanosomatidae, como *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp., las cuales se han basado principalmente en la detección de dichos agentes, dejando de lado aspectos macroambientales y de caracterización molecular.

Este estudio tuvo como objetivo detectar y caracterizar los murciélagos positivos a *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp., describir los factores macroambientales de sitios de captura e identificar por métodos moleculares estos hemoparásitos con el fin de aportar información que pueda contribuir al entendimiento de las relaciones filogenéticas parásito/hospedador y posibles relaciones ecoepidemiológicas.

Durante junio 2013 a agosto 2014, se realizó un estudio transversal en 11 sitios de diferentes provincias de Costa Rica, donde se capturó un total de 98 murciélagos, en su mayoría de los géneros *Artibeus*, *Glossophaga*, *Carollia* y *Sturnira*. Se anotó las medidas biométricas, peso, sexo, grupo etario y condición reproductiva y se tomó muestras de sangre de cada individuo. Las muestras sanguíneas fueron analizadas mediante PCR amplificando una región del gen 18S ADNr para determinar la presencia de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. Se realizó un análisis de las características macroambientales de los sitios de captura en los cuales se encontró murciélagos positivos a hemoflagelados. Para ello, se

utilizaron las capas vectoriales de temperatura, precipitación, cobertura y uso de suelo del Atlas de Costa Rica. Finalmente, se estudiaron las relaciones filogenéticas de las secuencias encontradas en los murciélagos del presente estudio con secuencias de otros tripanosomátidos descritas anteriormente por otros investigadores.

Se encontró *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. en murciélagos *Glossophaga soricina*, *Carollia sowelli*, *Carollia perspicillata* y *Artibeus jamaicensis*. De las características de hospedero y macroambientales evaluadas, el peso del murciélago y la precipitación se establecieron como posibles variables relacionadas con la presencia de estos tripanosomátidos.

La secuenciación de un segmento de 480 pb del gen 18S ADNr de las muestras de sangre de los murciélagos positivos a hemoflagelados mostraron 99-100% de identidad nucleotídica con *Trypanosoma cruzi* (442pb/442pb, 426pb/428pb, 432pb/433pb) y *Trypanosoma minasense* (346pb/347bp, 348pb/348bp, 368pb/370pb). Los resultados del análisis filogenético apoyan la separación de *Trypanosoma minasense* de *Trypanosoma rangeli* y *T. cruzi*. La presente investigación provee un estudio base y aporta información sobre las relaciones filogenéticas de los hemoflagelados asociados a los quirópteros del Continente Americano.

### III. Summary

Bats are a mammalian group with high diversity that play a very important role in the ecologic process of the rain forest. Despite of that, nowadays they have been threatened by fragmentation, habitat degradation, disinformation and pesticides which trigger changes in food offer affecting the community dynamics.

Historically they have been associated with several infectious agents like viruses, bacteria, fungi and parasites. Taking in account research about parasites, highlight mainly in the detection of hemoflagellates from the family Trypanosomatidae, such as *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp., leaving behind macroenvironmental aspects and molecular characterization.

The aim of this study was to characterize bats positives and negatives to *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp., describe macroenvironmental factors from capture sites and identify the hemoflagellates by molecular methods to generate information that can contribute to the understanding of the parasite/host phylogenetic relationships.

During June 2013 and August 2014, a transversal study was made in 11 sites, from eight localities from Costa Rica, where a total of 98 bats were capture. The majority from the genera *Artibeus*, *Glossophaga*, *Carollia* and *Sturnira*. Biometric measures, weight, sex, age group and reproductive condition was recorded and blood samples were taken from each individual. Blood samples were analyzed by PCR amplifying the 18S gen región to determine the presence of *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. A macroenvironmental characteristic analysis was performed from capture sites. Bats that are positive to hemoflagellates were found using vector layers of temperature, rainfall, coverage and land use with the Costa Rica Atlas (2014) and phylogenetic relationships of the obtained sequences were compared with reported tripanosomatides sequences.

*Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. were found in *Glossophaga soricina*, *Carollia sowelli*, *Carollia perspicillata* and *Artibeus jamaicensis*. The host and

macroenvironmental characteristic was evaluated and showed how the bat weight and rainfall related to the presence of this tripanosomatides.

Sequence of the 480 bp segment of the gene 18S from positive bat blood samples showed 99% of nucleotic identity with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma minasense* and the results from the phylogenetic analysis support the detachment of *Trypanosoma minasense* from *T. rangeli* and *T. cruzi*. Thus, this research generate a baseline which contributes the understanding of thle phylogenetic relationships of the hemoflagellates associated to quiroptera in America.

#### **IV. Agradecimientos**

A Dios y a la vida por permitirme ser parte de este proceso de Postgrado en Medicina de la Conservación.

A la Dra. Andrea Urbina, tutora y coordinadora del Laboratorio de Zoonosis y Micología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, por el conocimiento que me ha transmitido y por el apoyo que me ha brindado.

A la Dra. Gaby Dolz y Dr. Marco Vinicio Herrero, asesores, por todo su apoyo.

A Ruth Castro por su apoyo en el análisis filogenético de las secuencias de tripanosomátidos.

A todos los miembros del proyecto “Murciélagos como bioindicadores de agentes infecciosos: hongos, virus y parásitos” de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica”, por permitirme ser parte de este proyecto.

A la M.Sc. Karen Sibaja del ICOMVIS y a los estudiantes de la Escuela de Medicina Veterinaria que colaboraron en la recolección de muestras.

A Alejandra Calderón, Dionei Quesada, Fabián Castro, Xindy Víquez, Andrés Villalobos, Anthony Solórzano, Lilliana Campos y demás compañeros de trabajo y amigos por el apoyo.

A la M.Sc. Viviana Narváez, de Wildlife Conservation Society, Ecuador, por el apoyo con material bibliográfico, fotografías y motivación. Gracias por creer en mí.

A toda mi familia por la motivación y el apoyo brindado durante todos mis años de estudio.



## V. Índice

II. Resumen.....	4
III. Summary.....	6
IV. Agradecimientos.....	8
V. Índice.....	9
VI. Lista de cuadros.....	10
VII. Lista de Figuras.....	11
VIII. Lista de abreviaturas.....	12
IX. Descriptores.....	13
1. Introducción general.....	14
1.1 Beneficios de los murciélagos.....	16
1.2 Impactos y amenazas para los quirópteros.....	17
1.3 Microorganismos infecciosos, no infecciosos y parasitarios en murciélagos.....	18
1.4 Caracterización molecular de tripanosomatidos en murciélagos.....	20
2. Justificación.....	22
3. Objetivos.....	23
Descripción de características del hospedero y características macroambientales de sitios de captura de murciélagos con presencia de hemoflagelados de <i>Leishmania</i> spp. y <i>Trypanosoma</i> spp. en Costa Rica.....	24
Introducción.....	26
Metodología.....	29
Resultados.....	35
Discusión.....	48
Caracterización molecular y análisis filogenéticos de hemoflagelados tripanosomátidos de murciélagos de Costa Rica.....	55
Introducción.....	57
Materiales y métodos.....	60
Resultados.....	62
Discusión.....	66
Conclusiones.....	70
Recomendaciones.....	71
Referencias bibliográficas.....	72

## VI. Lista de cuadros

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.1.</b> Especies de murciélagos muestreados en 11 sitios de las provincias de Limón, Heredia, Puntarenas, Guanacaste y Cartago de Costa Rica.....	36
<b>Cuadro 1.2.</b> Especies de murciélagos, sitios de captura y características de los individuos positivos a <i>Leishmania</i> spp. mediante PCR.....	37
<b>Cuadro 1.3.</b> Especies de murciélagos, sitios de captura y características de los individuos positivos a <i>Trypanosoma</i> spp. mediante PCR. ....	38
<b>Cuadro 1.4.</b> Especies de murciélagos, sitios de captura y especie de tripanosomátido identificado mediante secuenciación .....	39
<b>Cuadro 1.5</b> Modelos de regresión logística para eventos raros que relacionan las características de hospedero y la presencia/ausencia de <i>Leishmania</i> spp. ....	45
<b>Cuadro 1.6.</b> Modelos de regresión logística para eventos raros que relacionan las características de hospedero y la presencia/ausencia de <i>Trypanosoma</i> spp. ....	45
<b>Cuadro 1.7.</b> Modelos de regresión logística para eventos raros que relacionan las características macroambientales y la presencia/ausencia de <i>Leishmania</i> spp. ....	46
<b>Cuadro 1.8.</b> Modelos de regresión logística para eventos raros que relacionan las características de hospedero y la presencia/ausencia de <i>Trypanosoma</i> spp. ....	47
<b>Cuadro 2.1</b> Especies de tripanosomátidos identificadas mediante secuenciación según especies de murciélagos, sitios de captura y porcentaje de similitud con secuencia de GenBank más cercana.....	63

## VII. Lista de Figuras

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.1.</b> Distribución de las áreas de amortiguamiento de los sitios de captura de murciélagos positivos a <i>Leishmania</i> spp. ....	40
<b>Figura1.2.</b> Distribución de las áreas de amortiguamiento de sitios de captura de murciélagos con presencia de <i>Trypanosoma</i> spp. ....	42
<b>Figura 2.1.</b> Árbol filogenético generado para las secuencias amplificadas con la región 18S ADNr por Máxima Verosimilitud .....	65

## **VIII. Lista de abreviaturas**

**BLAST:** Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico

**CONAGEBIO:** Consejo Nacional de Genética y Biodiversidad

**EMV:** Escuela de Medicina Veterinaria

**GPS: Sistema de Posicionamiento Global** (Global Position System)

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**pb:** pares de bases

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**P.N.:** Parque Nacional

**SINAC:** Sistema Nacional de Áreas de Conservación

**UNA:** Universidad Nacional de Costa Rica

## **IX. Descriptores**

*Leishmania* spp.

*Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma minasense*

Características macroambientales

Murciélagos generalistas

Detección molecular

Análisis filogenéticos

## 1. Introducción general

Los murciélagos o quirópteros son uno de los grupos de mamíferos más exitosos en cuanto a riqueza de especies y diversidad ecológica. Se diferencian de otros mamíferos principalmente porque poseen un conjunto de adaptaciones morfológicas, fisiológicas y etológicas asociadas a una serie de cambios evolutivos que han ocurrido a través de millones de años (Laval y Rodríguez-Herrera 2002, Rodríguez-Herrera et al. 2007). Destaca como parte de estas adaptaciones, el alargamiento de los huesos de la mano, lo que le ha proporcionado un apoyo estructural a una doble membrana de piel, así como un punto de unión de vasos sanguíneos, tendones y músculos que les da la capacidad mover el ala y les da la capacidad de volar (Laval y Rodríguez-Herrera 2002). A esto se suma el desarrollo de un eficiente sistema de ecolocalización que les ha permitido tener acceso a una gran variedad de hábitats y recursos alimenticios y así colonizar una amplia variedad de ecosistemas (Burneo et al. 2015).

En el mundo se conocen más de 925 especies de murciélagos clasificados en 2 subórdenes: el orden Megachiroptera y el orden Microchiroptera (Rodríguez-Herrera et al. 2007). Los megaquirópteros, conocidos como zorros voladores, incluyen una familia constituida por 166 especies de murciélagos que se restringen a las zonas tropicales y subtropicales del Viejo Mundo; mientras que el orden Microchiroptera cuenta con 759 especies que se distribuyen en todo el mundo (Laval y Rodríguez-Herrera 2002).

A esta amplia diversidad de especies se suma una serie de variaciones morfológicas y ecológicas especializadas según el tipo de hábitat en el que se desarrollan y el gremio trófico al que pertenecen las distintas especies de murciélagos (Rodríguez-Herrera et al. 2007). Por ejemplo, variaciones anatómicas en el tamaño y forma de las alas se relacionan con sus sistemas de alimentación y estilo de vuelo. Murciélagos de vuelo lento, que se alimentan de frutos, néctar o insectos, que se posan en la hojarasca o el follaje, han desarrollado alas cortas y amplias, mientras que murciélagos que realizan vuelos rápidos han desarrollado alas largas y angostas (Laval y Rodríguez-Herrera 2002). De igual manera, existen variaciones en los tamaños de los dientes, uropatagio, cola, orejas, forma y tamaño de la hoja nasal, asociadas a variaciones ecológicas en cada especie. Así mismo, los quirópteros tienen un rango

alimenticio muy amplio y variado. Existen especies insectívoras, frugívoras, nectarívoras-polinívoras, carnívoras y en el Neotrópico, especies exclusivamente hematófagas (Laval y Rodríguez-Herrera 2002). Habitan casi cualquier ecosistema, incluso zonas urbanas. Durante el día se refugian en colonias en diversos sitios, incluyendo desde cuevas, árboles huecos, grietas en rocas, hasta casas, edificios, puentes y alcantarillas. Al caer la noche abandonan sus refugios y se trasladan a sus sitios de forrajeo dependiendo de su gremio alimenticio (Sánchez-Rojas y Rojas-Martínez 2007).

En el Neotrópico, la familia más diversa de murciélagos es la Phyllostomidae la cual incluye más de 100 especies distribuidas en 6 subfamilias, cada una de ellas con características de dieta y comportamientos distintos (Gardner 1977). Por ejemplo, las subfamilias Carollinae y Stenodermatinae ambas tienen dietas basadas en frutas (Rodríguez-Herrera et al. 2007) y presentan una mayor capacidad de adaptación, son abundantes en la vegetación secundaria y se benefician con algún grado de perturbación (Medellín et al. 2000). En áreas con bajos niveles de deforestación estos murciélagos suelen cruzar las áreas abiertas perturbadas en su búsqueda de alimento y refugio en los fragmentos de bosque (Fenton et al. 1992).

Caso contrario ocurre con la subfamilia Phyllostominae, en la cual la mayoría de las especies se alimenta principalmente de pequeños vertebrados y algunas pocas especies tienen dietas más diversas, que incluyen tanto insectos como frutas. Debido a estos requerimientos alimenticios y la disponibilidad de presas animales, este grupo es más sensible a la deforestación y a los niveles de perturbación del hábitat por lo que son más abundantes en los bosques maduros y de rara aparición en bosques secundarios o en regeneración (Faria 2006, Galindo-González 2007).

Dentro del grupo de los filostómidos está también la subfamilia Desmodontinae, formada únicamente por tres especies de murciélagos cuya dieta es exclusivamente de sangre. La especie más representativa de esta subfamilia es el vampiro común (*Desmodus rotundus*), cuya distribución responde a la disponibilidad del ganado del que se alimenta (Fenton et al. 1992).

Por otra parte, las subfamilias Glossophaginae y Phyllonycterinae incluyen especies que se alimentan principalmente de néctar y el polen (Lemke 1984, Fenton et al. 1992), por lo que la composición vegetal del ecosistema es el factor limitante que determina la presencia de esta subfamilia, de manera que es más común encontrarlos en bosques secundarios con plantas que dispongan de flores con estadios de sucesión temprana (Kalko et al. 1998).

Dada la capacidad que tienen los murciélagos de adaptarse a gran diversidad de ecosistemas, muchas especies de murciélagos generalistas se consideran especies sinantrópicas, que son aquellas capaces de adaptarse, permanecer y mantenerse en los espacios habitados por el hombre. Destacan entre ellas especies como *Carollia perspicillata*, *Carollia brevicauda*, *Artibeus jamaicensis*, *Sturnira lillium* y *Glossophaga soricina*, las cuales son especies abundantes en hábitats perturbados y antropogénicos (Delgado et al. 2007).

### **1.1 Beneficios de los murciélagos**

El orden de los quirópteros juega un papel muy importante en los procesos ecológicos que ocurren en los bosques tropicales debido a sus diversos hábitos de alimentación, sus esquemas co-evolutivos con las plantas, su abundancia, su alta diversidad ecológica, sus adaptaciones para la búsqueda de alimentos y su potencial de desplazarse a áreas extensas en un paisaje fragmentado (Medellín y Gaona 1999, Meyer et al. 2008).

Los murciélagos frugívoros de las subfamilias Carollinae y Stenodermatinae cumplen con la función de ser importantes dispersores de semillas contribuyendo con el proceso de regeneración de bosques tropicales, permitiendo la dispersión y la colonización de nuevos hábitats por distintas especies de fauna y flora y reduciendo el impacto de la fragmentación (Rodríguez-Herrera et al. 2007). Por otra parte, los murciélagos de las subfamilias Glossophaginae y Phyllonycterinae, dados sus hábitos de alimentación similar a la de los colibríes, son importantes polinizadores en los bosques tropicales. Los miembros de las familias Mormoopidae y Vespertilionidae, por sus hábitos de alimentación, son



depredadores de insectos voladores nocturnos, muchos de ellos, insectos responsables de la transmisión de agentes causantes de enfermedades como el dengue y la malaria (Laval y Rodríguez-Herrera 2002, Burneo et al.2015). Además, dichos murciélagos se alimentan de insectos que son potenciales plagas para cultivos, por lo que contribuyen al ahorro de millones de dólares en pesticidas destinados a controlar dichas plagas (Burneo et al. 2015).

## **1.2 Impactos y amenazas para los quirópteros**

Las principales amenazas a la diversidad de los murciélagos son la fragmentación y degradación del hábitat, provocada principalmente por las actividades humanas (Galindo-González 2007). Dichas amenazas afectan la riqueza y la abundancia de estos mamíferos, ya que los cambios en la oferta alimenticia afectan la dinámica y ensamble de las comunidades de murciélagos (Medellín et al. 2000, Sánchez-Azofeifa et al. 2001). Uno de los efectos de la fragmentación sobre las comunidades de murciélagos es la pérdida de especies de quirópteros con requerimientos especializados de hábitat y consecuentemente un incremento en la abundancia de especies generalistas (Galindo-González 2007, Meyer et al. 2008, Mena y Medellín. 2010). Por ejemplo, se reporta que especies dependientes de hábitat como *Trachops cirrhosus* y *Tonatia silvícola*, al no tolerar los espacios abiertos, ni volar fuera de la cobertura vegetal son muy sensibles a extinciones locales ante un aumento en la fragmentación del paisaje (Kalko et al. 1998), mientras que especies adaptables como *C. perspicillata*, *A. jamaicensis* y *S. lillium* son los más tolerantes a las perturbaciones, e incluso posiblemente se benefician por los efectos de los cambios, ya que utilizan los ambientes transformados, los corredores riparios, la vegetación secundaria e incluso arbustos aislados en pastizales (Galindo-González 2007). Sin embargo, no se han descrito exactamente cuáles son los efectos principales de la alteración del hábitat en los murciélagos ya que la mayoría de los estudios se limita a sitios en particular (son escasos los estudios a escala de paisaje) o solo se han capturado murciélagos a nivel del suelo, generando un sesgo hacia la captura de cierto tipo de especies (Galindo-González 2007). Otros factores humanos que reducen la población de murciélagos son el uso descontrolado de pesticidas y químicos tóxicos, el cambio climático y el aumento acelerado de la población humana (Laval y Rodríguez-Herrera 2002, Rodríguez 2013).

Otra amenaza para este grupo de mamíferos es la desinformación. La mayoría de los habitantes latinoamericanos cuenta con muy poca información sobre los murciélagos. Existen mitos que los hacen creer que todos los murciélagos son vampiros transmisores de muchas enfermedades, motivo por el cual son capturados y exterminados (Laval y Rodríguez-Herrera 2002).

A pesar de las amenazas descritas, muchas poblaciones de murciélagos se han logrado mantener gracias a su capacidad para adaptarse a los cambios antropogénicos, demostrada por el hecho de que incluso después de la urbanización extensiva, algunos siguen encontrando las perchas y los alimentos que necesitan (Galindo-González 2007). Debido a esto, y al compartir espacios físicos con el humano, frecuentemente se producen conflictos con las personas por la acumulación de excrementos o incluso por la aparición de los mismos murciélagos (Burneo et al. 2015).

### **1.3 Microorganismos infecciosos, no infecciosos y parasitarios en murciélagos**

Los murciélagos se han asociado históricamente con una serie de microorganismos infecciosos y no infecciosos que pueden ser patógenos o no para el hospedador o los humanos. Destacan agentes virales como el Virus de Ébola, Virus de la Encefalitis Equina, Coronavirus similares a los que ocasionan el Síndrome Agudo Respiratorio Severo (SARS) (Wang et al. 2006), el Virus de la Rabia, transmitida por murciélagos hematófagos de la subfamilia Desmodontinae (Schneider y Burgoa 1995), Nipahvirus y Hendravirus, detectados por primera vez en murciélagos de la fruta del género *Pteropus* spp. en Malasia, Singapur, y Australia, respectivamente (Calisher et al. 2008). Además, agentes bacterianos patógenos tales como *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp. y *Clostridium* spp. en individuos de la familia Vespertilionidae; *Shigella* spp. y *Salmonella* spp. en las familias Molossidae, Vespertilionidae y Phyllostomidae (Mühldorfer 2013) y agentes micóticos como *Histoplasma capsulatum* (Panizo et al. 2001), encontrada en cuevas con guano de murciélagos de nuestro país y reportado por Lyon et al. en el 2004.

Así mismo se han aislado en murciélagos diferentes especies de parásitos protozoarios de la familia Trypanosomatidae, que pueden ser o no especies patógenas. Destacan como parte de estos agentes parasitarios patógenos para humanos, los hallazgos de tripanosomátidos de los géneros *Leishmania* (Lima et al. 2008, Savani et al. 2010, Shapiro et al. 2013, Kassahun et al. 2015, Viquez-Rodríguez 2015) y *Trypanosoma* (Lisboa et al. 2008), dos grupos de parásitos que incluyen especies causantes de la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas en animales y humanos (Torrico et al. 2013). En África, se ha reportado en murciélagos del género *Pteropus* sp. la presencia de *Leishmania tropica* y *Leishmania major*, conocidos agentes causantes de leishmaniasis cutánea (Kassahun et al. 2015). En América, se ha reportado la presencia de diferentes especies de *Leishmania* en quirópteros generalistas de distintas zonas geográficas. Por ejemplo, en Venezuela se halló *Leishmania chagasi* - agente causal de leishmaniasis visceral y cutánea- y en Brasil, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania infantum* (Savani et al. 2010, Shapiro et al. 2013). La presencia de *Trypanosoma cruzi* ha sido reportado infectando animales de Panamá y Brasil (Cottontail et al. 2009, Maia Da Silva et al. 2009, Cottontail et al. 2014).

Por otra parte, se ha reportado la presencia de especies de tripanosomátidos no patógenos para humanos como *Trypanosoma evansi* en mamíferos voladores de Venezuela (Silva-Iturriza et al. 2013), *Trypanosoma marinkellei* y *Trypanosoma dionisii* en Bolivia (Torrico et al. 2013), y *Trypanosoma rangeli* en Brasil (Maia Da Silva et al. 2009).

En Costa Rica, la presencia de hemoflagelados en murciélagos de Costa Rica se reduce a los reportes de *Trypanosoma vespertilionis* en individuos de *Glossophaga Soricina* de Santa Ana, provincia de San José (Zeledón y Vieto 1957) y *Trypanosoma leonidasdeanei* en un *Sarcopterix billineata* de Guápiles, provincia de Limón (Zeledón y Rosabal 1969. No se ha reportado hasta el momento *Leishmania* spp., ni *T. cruzi* en especies de este grupo de mamíferos de nuestro país.

Por otro lado, investigaciones que describan las características ecológicas de los sitios donde se han capturado murciélagos positivos a hemoflagelados son muy escasas. Destacan en Latinoamérica las investigaciones realizadas por Cottontail y colaboradores (2009) y

Viquez-Rodríguez (2015). En ambos estudios se evalúa la presencia de hemoflagelados en bosque fragmentado y no fragmentado, y encuentran relación entre los hallazgos parasitológicos en los murciélagos con los diferentes grados de fragmentación, lo cual apoya las afirmaciones de que ambientes fragmentados y con un menor número de especies se asocian con el incremento de enfermedades; esto debido a que según la teoría del efecto de dilución, en sitios con una diversidad de especies reducida se favorece el contacto de los vectores con los hospedadores (Allan et al. 2003, Keesing et al. 2006). Con esta información, Cottontail y colaboradores (2009) y Viquez-Rodríguez (2015) buscan contribuir con el entendimiento de las relaciones entre los cambios ecosistémicos, los tripanosomátidos y sus hospederos (Cottontail et al. 2009, Viquez-Rodríguez 2015).

#### **1.4 Caracterización molecular de tripanosomátidos en murciélagos**

Los tripanosomátidos muestran una gran variedad y complejidad genética. Por ende, la descripción molecular y la secuenciación del genoma de los parásitos kinetoplástidos busca proporcionar caracteres adicionales para análisis filogenéticos que ayuden a entender las relaciones evolutivas y las asociaciones ecológicas de este grupo (Hughes y Piontkivska 2003, Izeta-Alberdi et al 2016).

Ante esto, diferentes investigadores han trabajado en la implementación de técnicas moleculares y la identificación de marcadores genéticos que permitan distinguir las subpoblaciones de parásitos tripanosomátidos, los procesos selectivos y su filogenia (Cottontail et al. 2014, Messenger et al. 2015, Tomasini y Diosque 2015). Por ejemplo, en las últimas dos décadas, el análisis filogenético de la subunidad del gen 18S ADNr ha llevado a cambios importantes en la clasificación de los flagelados kinetoplástidos (d'Avila-Levy et al. 2015).

La caracterización de las cepas de tripanosomátidos a nivel molecular ha sido fundamental para la comprensión de la epidemiología de las enfermedades asociadas a estos parásitos (Tibayrenc 1998, Hughes y Piontkivska 2003). En el caso del género

*Leishmania*, la identificación de las principales ramas evolutivas ha permitido confirmar las diferentes especies responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, y en el caso del género *Trypanosoma*, se ha demostrado que este grupo taxonómico posee una gran heterogeneidad genética y biológica en sus poblaciones (Tibayrenc et al. 1991).

Mediante análisis moleculares se ha reportado la presencia de *T. rangeli*, *T. cruzi*, *T. marinkellei* y *T. dionisii* aislados de sangre de murciélagos de Brasil (Maia Da Silva et al. 2009) y en Panamá. Cottontail y colaboradores (2014) identificaron, mediante análisis filogenéticos de tripanosomátidos de murciélagos, tentativamente cinco aparentes subespecies de tripanosomas pertenecientes a *T. cruzi*. Así mismo, mediante el uso de varios marcadores moleculares se han definido siete linajes o unidades discretas de tipificación (DTU) que incluyen TcI-TcVI y Tcbat exclusivos de murciélagos (Zingales et al., 2012).

La aparición frecuente de nuevas cepas asociadas a las diferentes especies de quirópteros en los diferentes países del Continente Americano demuestra que aún existen muchos vacíos en el conocimiento de este grupo taxonómico, por lo que las asociaciones epidemiológicas y filogenéticas han sido muy controversiales (Barnabè et al. 2003, Sato et al. 2008, Brenière y Waleckx 2009, Cottontail et al. 2014).

## 2. Justificación

Los cambios ambientales provocados por las actividades humanas pueden incidir en la presencia o ausencia de las diferentes especies de murciélagos en determinados sitios. Costa Rica tiene gran diversidad de murciélagos, pero se desconoce si estos mamíferos voladores alojan tripanosomátidos causantes de enfermedades.

Además, se desconocen las características macroambientales de los sitios donde se han capturado murciélagos que alojan tripanosomátidos, lo cual es importante investigar para conocer las posibles variables que podrían estar favoreciendo la presencia de estos microorganismos en estos mamíferos voladores. El estudio integrado de las características macroambientales, los parásitos y los murciélagos hospedadores contribuirá a entender aspectos de la ecoepidemiología de la tripanomiasis y la leishmaniasis en nuestro país.

Por otra parte, es importante caracterizar molecularmente las especies de *Leishmania* y *Trypanosoma* encontrados en murciélagos para analizar posibles relaciones filogenéticas y orígenes de estos parásitos, como parte esencial de la epidemiología de las enfermedades. De detectar tripanosomátidos en murciélagos, la caracterización molecular y el análisis filogenético permitiría establecer relaciones filogeográficas y filoespecíficas entre las secuencias de los parásitos aislados en estos mamíferos en Costa Rica con las secuencias de tripanosomátidos de otros países.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo general

- Identificar parásitos de la familia Trypanosomatidae en murciélagos generalistas de Costa Rica, para analizar posibles relaciones ecoepidemiológicas, describiendo los sitios de captura, características del huésped y características moleculares de los parásitos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. en sangre de murciélagos de los géneros *Carollia* spp., *Glossophaga* spp., *Artibeus* spp. y *Sturnira* spp. para verificar si son portadores de estos microorganismos.
- Describir las características del huésped y las macroambientales de los sitios de captura de murciélagos para analizar posibles asociaciones con los individuos positivos y negativos a hemoflagelados.
- Realizar la caracterización molecular de los parásitos de *Leishmania* y *Trypanosoma* para confirmar las especies e identificar sus relaciones filogeográficas y filoespecíficas.

## **Descripción de características del hospedero y características macroambientales de sitios de captura de murciélagos con presencia de hemoflagelados de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. en Costa Rica.**

Hemoflagelados de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* en murciélagos han sido reportados en diferentes regiones geográficas del mundo. En Costa Rica no hay estudios actualizados de estos parásitos ni de las características del hospedero y las macroambientales, lo cual es importante de realizar para comprender las posibles interacciones entre murciélagos y el ambiente. El presente estudio describe las características de los murciélagos y las macroambientales de sitios de captura de murciélagos generalistas de Costa Rica en 11 localidades distintas de cinco provincias de Costa Rica entre los meses de junio 2013 a agosto 2014. Se obtuvo un total de 98 muestras de sangre de murciélagos, las cuales fueron analizadas mediante PCR para la detección de presencia de parásitos de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp.; a la vez, se describe las características de los murciélagos positivos a estos hemoflagelados. Cuatro muestras de las 98 resultaron positivas para *Leishmania* spp. (4.08%) y nueve para *Trypanosoma* spp. (9.18%). El análisis de modelos estadísticos de las características de los sitios de captura y las del hospedero no mostró asociación fuerte entre las variables evaluadas y la presencia de hemoflagelados en las especies de murciélagos en estudio. Sin embargo, el peso del murciélago y la precipitación se anotan como posibles variables relacionadas con la presencia de estos tripanosomátidos, por lo que se recomienda incluirlas en futuros estudios con un mayor número de muestras o nuevos modelos de análisis de variables consideradas influyentes. Se reporta por primera vez la presencia de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi* en murciélagos generalistas de Costa Rica y se confirma la presencia de *T. minasense* en estos mamíferos voladores.

**Palabras clave:** características macroambientales, Costa Rica, hemoflagelados, hospedero, *Leishmania*, Murciélagos, *Trypanosoma*.



## **Host and macroenvironmental characteristic description from capture sites and the hemoflagellates *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. present in bats in Costa Rica**

Hemoflagellates from the genera *Leishmania* and *Trypanosoma* have been reported in bats from several geographic regions of the world. In Costa Rica, there are no recent studies from these parasites or the host and macroenvironmental characteristic which is important in order to understand possible bat/environment interactions. The present study describes bat and macroenvironmental characteristics from capture sites of generalistic bats. We captured the bats in, in 11 localities from five provinces of Costa Rica, between June 2013 and August 2014. A total of 98 blood samples from bats were analyzed by PCR in order to detect *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp.; both describes characteristics of bats positive to hemoflagellates. Four of the 98 samples were positive to *Leishmania* spp. (4.08%) and nine samples were positives to *Trypanosoma* spp. (9.18%). Statistical analysis from the capture sites and host characteristics did not showed strong association beetwen evaluated variables and the presence of tripanosomatides. Thus is recomended to include them in future studies with higher sample numbers or new variable models analysis that are considered influential. It is reported for the first time *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* in generalistic bats and it is confirmed the presence of *T. minasense* in these species of mamals.

**Key words:** bats, Costa Rica, host, hemoflagellates, *Leishmania*, macroenvironmental characteristics, *Trypanosoma*.

## Introducción

Los quirópteros constituyen uno de los grupos de mamíferos más exitosos debido a que poseen un conjunto de adaptaciones morfológicas, fisiológicas y etológicas asociadas a una serie de cambios evolutivos que han ocurrido a través de millones de años (Laval y Rodríguez-Herrera 2002). Dada su elevada riqueza específica y características ecológicas, han sido considerados como bioindicadores de los ecosistemas (Fenton et al. 1992, Kalko et al. 1998). Es por esto que el análisis de las variaciones en la diversidad de especies presentes en un sitio y las diferentes maneras en que los murciélagos tropicales explotan los recursos tróficos, hacen que este grupo ofrezca una amplia visión de la "salud" de un ecosistema (Fenton et al. 1992). Se ha demostrado que los murciélagos son significativamente más diversos en sitios no perturbados que en los perturbados y se han asociado grupos taxonómicos (principalmente subfamilias) de acuerdo al grado de perturbación de los ecosistemas (Galindo-González 2007). Especies raras y con altos requerimientos de hábitat especializado son particularmente susceptibles a la fragmentación, y en muchos casos intolerantes a los sitios abiertos, por lo cual ante la presencia de áreas altamente alteradas se convierten en zonas inhóspitas para el desarrollo normal de estas especies, a tal grado que provoca la reducción de las poblaciones e incluso la extinción local de especies (Galindo-González 2007). Además de esta asociación entre la presencia de grupos taxonómicos específicos y el tipo de ecosistema asociado, existen murciélagos denominados generalistas, los cuales aprovechan los recursos disponibles en todo el paisaje, pueden realizar cambios de dieta según disponibilidad de recursos y por ende se benefician de los cambios en los ecosistemas y contribuyen a su vez a enriquecerlos (Mena y Medellín 2010).

Es poca la información disponible sobre el estado de salud y microorganismos en murciélagos. Se han reportado diferentes especies microorganismos infecciosos (Wang et al. 2006, Calisher et al. 2008, Lima et al. 2008, Mühlendorfer 2013) así como no infecciosos para los seres humanos (Ewers 1974, Marinkelle 1977, Brun et al. 1998). Destacan como parte de los agentes parasitarios los hallazgos de tripanosomátidos en murciélagos, los cuales han sido encontrados tanto en especies de África (Kassahun et al. 2015), como en las que habitan en el Neotrópico (Lima et al. 2008, Savani et al. 2010, Shapiro et al. 2013).

En África, Kassahun et al. (2015) reportaron la presencia de *Leishmania tropica* y *Leishmania major*, conocidos agentes causantes de leishmaniasis cutánea, en 8 de 163 muestras de bazo de murciélagos evaluados mediante la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Este constituye el primer reporte de infección natural de estas especies de *Leishmania* en murciélagos de esa región.

Por otra parte, en América, se ha reportado la presencia de diferentes especies de *Leishmania* en murciélagos generalistas de distintas zonas geográficas; por ejemplo, en Venezuela se detectó, mediante técnicas moleculares, la presencia de *Leishmania chagasi* - conocido agente causal de leishmaniasis visceral y cutánea- en Europa y en América- en sangre de un murciélago *Carollia perspicillata*, de la cual se obtuvieron resultados positivos tanto en el hemocultivo como en la PCR, lo que lo convirtió en el primer reporte para *Leishmania* en murciélagos de la región (Lima et al. 2008). En Brasil, mediante las pruebas de inmunofluorescencia indirecta y de PCR, se ha demostrado la presencia de los agentes *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania infantum* en especies de murciélagos generalistas que habitan en zonas donde la *Leishmania* es considerada endémica (Savani et al. 2010, Shapiro et al. 2013). Como parte de las investigaciones en Brasil se destaca el estudio realizado por Savani et al. (2010), quienes tras el análisis con la PCR de 659 muestras de sangre y tejidos de bazo e hígado de murciélagos detectaron una prevalencia de 2.7% de *L. amazonensis* en murciélagos de nueve especies distintas, dentro de las que se encontraron *Glossophaga soricina*, *Artibeus lituratus* y *Sturnira lillium*, todas ellas comunes en nuestro país (Laval y Rodríguez 2002). También sobresale en Brasil el estudio realizado por Shapiro et al. (2013), quienes mediante el análisis por PCR de muestras de piel, hígado y sangre de cinco murciélagos de Matto Grosso do Sul, realizaron el primer reporte de presencia de *L. braziliensis* en estos mamíferos. Es importante resaltar que en este estudio los especímenes que mostraron resultados positivos correspondieron a individuos de las especies generalistas *Glossophaga soricina* y *Molossus molossus*, capturados en una zona boscosa y una urbana, respectivamente. Así mismo, murciélagos de las especies *A. lituratus*, *G. soricina* y *M. molossus*, reportados con hallazgos positivos de *Leishmania* spp. son gregarios y cuelgan comúnmente en edificios, puentes y techos de las casas, por lo que comparten espacios frecuentados por seres humanos (Laval y Rodríguez 2002).

A pesar de los hallazgos de la presencia de especies de parásitos causantes de la leishmaniasis en las distintas especies de murciélagos, aún se desconoce el rol que desempeñan estos mamíferos en el ciclo de transmisión de los agentes causales de la enfermedad (Lima et al. 2008, Shapiro et al. 2013) y si existe alguna afectación para el murciélago ante la presencia de la *Leishmania* en su organismo (Cottontail et al. 2009).

Por otra parte, la presencia de *Trypanosoma* spp. en los murciélagos fue reconocida desde el siglo anterior (Hoare 1972) y ha continuado siendo objeto de estudio por parte de investigadores en vida silvestre en los últimos años (Cottontail et al. 2009). *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la tripanosomiasis americana o mal de Chagas, ha sido reportado infectando murciélagos de Panamá (Cottontail et al. 2009, Cottontail et al. 2014). Otra especie de tripanosomátido asociada a los murciélagos del Neotrópico es *Trypanosoma evansi*, la cual ha sido asociada con *Desmodus rotundus*, considerándose a este vampiro como especie transmisora de dicho agente (Brun et al. 1998). A esto se suma la investigación de Silva-Iturriza et al. (2013) quienes reportan la presencia de *T. evansi* en murciélagos nectarívoros de la especie *Leptonycteris curasoae* en Venezuela. Así mismo, en Bolivia se aislaron por hemocultivo tripanosomátidos *T. cruzi marinkellei* y *Trypanosoma dionisii* a partir de murciélagos de la especie *Carollia perspicillata* capturados en las zonas de Carrasco Tropical de Cochabamba (Torrico et al. 2013). Al igual que en el caso de la leishmaniasis, la participación de los murciélagos en el ciclo de transmisión de los parásitos de *Trypanosoma* es aún desconocido.

En cuanto a la presencia de hemoflagelados en murciélagos de Costa Rica, únicamente existen reportes de presencia de *Trypanosoma vespertilionis* en cinco individuos de murciélagos *Glossophaga soricina* capturados en Santa Ana, provincia de San José (Zeledón y Vieto 1957) y *Trypanosoma leonidasdeanei* en un individuo de *Saccopteryx bilineata*, un murciélago insectívoro que habitaba en Guápiles, provincia de Limón (Zeledón y Rosabal 1969). No se ha reportado hasta el momento la presencia *Leishmania* spp. ni *T. cruzi* en murciélagos de nuestro país.

Las investigaciones asociadas a la temáticas de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. en murciélagos se han enfocado principalmente en la detección de dichos agentes, mientras que los estudios que evalúan las características ambientales o factores ecológicos asociados con la presencia de estos hemoflagelados son muy limitados. En Panamá, Cottontail y colaboradores (2009) realizaron una investigación en la cual, además de establecer la presencia de *T. cruzi* en los murciélagos, demostraron que la incidencia de este hemoflagelado era mayor en los capturados en los fragmentos aislados de bosque que en los murciélagos de bosque continuo. Los autores atribuyeron esta variación en la incidencia a cambios en la cobertura vegetal, la cual influye en la distribución y abundancia de los vectores de *Trypanosoma* spp. (Cottontail et al. 2009). Posteriormente, en México, Viquez-Rodríguez (2015) evaluó la existencia de un patrón de prevalencia de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. de acuerdo a las condiciones de hábitat (perturbado y conservado), sin obtener resultados concluyentes. Ambos autores sugirieron realizar nuevas investigaciones considerando factores ecológicos a nivel local.

Siendo Costa Rica un país endémico para la leishmaniasis cutánea (Jaramillo-Antillón et al. 2009) y para la enfermedad de Chagas (Zeledón et al. 1975), es importante conocer si los murciélagos pueden alojar estos hemoflagelados y si existe alguna relación entre las características del hospedero y sus sitios de captura. Esta información es importante para identificar posibles variables ambientales y del huésped que podrían asociarse a la presencia o ausencia de dichos parásitos en estos mamíferos. El presente estudio pretende describir el hallazgo de hemoflagelados en murciélagos de las especies *Carollia* spp., *Glossophaga* spp., *Artibeus* spp. y *Sturnira* spp., las características macroambientales de los sitios de captura y una posible relación con la presencia de especies de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. en sangre.

## **Metodología**

### **Tipo de estudio y diseño de muestreo**

Se realizó un estudio observacional, transversal, de tipo descriptivo mediante un muestreo aleatorio de murciélagos en bordes de bosque y zonas boscosas en regeneración,

tanto de fincas privadas como en zonas protegidas del Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC).

### **Sitios de captura de murciélagos**

El muestreo se realizó en 11 sitios de ocho localidades, ubicados en diferentes partes del país. Entre ellas se incluyó el cantón de Guápiles, sitio donde se había reportado la presencia de *T. leonidasdeanei* en murciélagos (Zeledón 1969), así como cuatro zonas endémicas para *Leishmania* spp. y sitios en los que no se habían reportado casos de leishmaniasis en humanos en los últimos años (periodo 2014-2014). El muestreo en las zonas endémicas para leishmaniasis se realizó en Talamanca (Reserva Kekoldi 9°38'16"N, 82°47'47"W), Turrialba (Reserva Waglelia 9°56'45"N, 83°41'24"W), Puerto Viejo Sarapiquí (Reserva Pozo Azul 10°23'56"N, 84°07'41"W; Finca Starke 10°26'19"N, 84°00'02"W y Ara Ambigua 10°27'22"N, 84°01'32"W) y Guápiles (Finca Corbana 10°09'52"N, 83°46'33"W), y el muestreo de sitios no endémicos en las localidades de Navarro en Orosí (9°49'33"N, 83°52'37"W), Parque Nacional (P.N.) Tapantí (9°46'52"N, 83°48'44"W), P.N. Carara (9°46'48"N, 84°36'19"W), P.N. Santa Rosa (10°50'04"N, 85°36'43"W) y P.N. Barra Honda (10°11'14"N, 85°19'07"W).

El muestreo se realizó en el marco del Proyecto “Murciélagos como bioindicadores de agentes infecciosos: hongos, virus y parásitos” de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica, por lo que contó con los permisos del Comité de Bioética de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, CONAGEBio (Expediente 163) y SINAC.

### **Captura de murciélagos, manipulación, identificación y toma de muestras de sangre**

En cada uno de los sitios de muestreo se colocaron cuatro redes de niebla japonesas tipo BWF 50diner/ 2ply, con abertura de malla de 1-1/2 y con dimensiones 12m de largo x 2,5m de ancho, ubicadas a nivel del suelo, las cuales se activaron durante una o dos noches, entre las 18:00 y las 22:00 horas, hasta completar el número de capturas esperado por sitio (entre 12 y 20 individuos). Durante las horas de muestreo, las redes fueron revisadas cada 20 minutos para la liberación de los individuos capturados.

## **Características de los murciélagos y toma de muestra de sangre.**

Una vez capturados, los individuos se identificaron taxonómicamente hasta el nivel de especie con base en caracteres taxonómicos externos propuestos por Timm et al. (1999) y Laval y Rodríguez (2002). Posteriormente se determinó el peso, el sexo (macho, hembra), la condición reproductiva (clasificados como animal inactivo o animal activo que incluye animales en gestación, lactación y machos activos) y grupo etario (adultos o juveniles). Las hembras que se determinaron en estado de gestación fueron liberadas inmediatamente (criterio de exclusión), a fin de evitar condiciones de estrés que pudieran tener repercusiones en el estado de salud del animal.

Con el fin de garantizar la bioseguridad de las personas que manipularon los murciélagos, se utilizaron guantes de látex, además mascarillas, para disminuir el riesgo de transmisión de agentes de animal a humano y viceversa por vía inhalatoria.

Posterior a la identificación y a la toma de las características biométricas de cada individuo, se procedió a tomar la muestra de sangre de la vena del propatagio o de la vena del área del patagio, mediante punción venosa con agujas de calibre 27 ó 30, siguiendo el protocolo utilizado por Schinnerl et al. (2011). En ninguna ocasión la muestra de sangre excedió el 1% de la masa corporal del individuo y en todos los casos se realizó hemostasis por medio de la aplicación de presión con torundas de algodón, humedecidas con etanol al 70%. Al finalizar la toma de la muestra se evaluó la condición del murciélago, se le suministró una solución alta en glucosa vía oral y se liberó.

Las muestras de sangre fueron colocadas en tubos mini collect con EDTA (1ml) y almacenadas en una hielera a baja temperatura (aprox. 4°C), hasta su transporte a la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (EMV-UNA), en donde se congelaron a -20°C. A cada muestra se le asignó un número consecutivo, que fue el código de identificación que se utilizó a lo largo de toda la investigación.

## **Detección molecular de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN de la sangre de los murciélagos se efectuó mediante la utilización del kit comercial QIAGEN, QIAamp® DNA Investigator (QIAGEN, Crawley, UK), siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial.

### **PCR para detección de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp.**

Se realizó el PCR para los géneros *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. a las muestras de sangre de los murciélagos capturados. Para el caso de *Leishmania* spp. se llevó a cabo un PCR convencional utilizando el protocolo descrito por Medeiros et al. (2002) quienes utilizaron un set de primers denominados 13A y 13B, el cual amplifica un segmento de 120 pb que corresponde a una región conservada del ADN del cinetoplasto, específico para *Leishmania* spp. La secuencia de los iniciadores fue la siguiente: 13A: (5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT - 3') y 13B: (5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT - 3'). Dichos cebadores se citan en la literatura y su utilidad para la amplificación del agente en estudio ha sido comprobada previamente (Medeiros et al. 2002, Morales-Cortendano 2012). Para la detección de *Trypanosoma* spp. se realizó una PCR tipo anidado siguiendo el protocolo descrito por Savani et al. (2005), quienes utilizaron los sets de primers S4 (5'-GAT CCA GCT GCA GGT TCA CC- 3') y S12 (5'-GGT TGA TTC CGT CCA CGG AC- 3'), que amplifica un segmento de 540pb del gen 18S ADNr y el set de primers S17 (5'-CCA AGC TGC CCA GTA GAAT-3') y S18 (5'-TCG GGC GGA TAA AAC ACC-3'), que amplifica un segmento de 490 pb del mismo gen. (Savani et al. 2005).

Como controles positivos se utilizaron muestras de ADN purificados a partir de las cepas de *Leishmania panamensis*, *L. braziliensis* y *L. chagasi*, donados por el Dr. Azael Saldaña, Departamento de Parasitología, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá; y muestras de ADN de *T. cruzi* aislados de *Triatoma dimidiata*, donadas por



el Laboratorio de Zoonosis, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. Como control negativo se utilizó agua.

### **Electroforesis de ADN en geles de agarosa y pruebas moleculares específicos**

La separación de los productos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, en TBE 1X (Tris Base, ácido bórico, EDTA, pH8, 0,5 M) teñidos con Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain y corridos a 90 V durante 30 minutos y la visualización de los productos amplificados se efectuó en un transiluminador UV BioDoc-it Imagine System. El tamaño de las bandas se estimó por comparación con el marcador de peso molecular GenRuler 100 pb DNA ladder Plus (Fermentas®) y las muestras que evidenciaron productos de tamaños 120pb y 490pb se consideraron como positivos para *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp., respectivamente. Los productos positivos para *Trypanosoma* spp. se enviaron a secuenciar a MACROGEN®, Korea con el fin de confirmar los resultados e identificar el agente a nivel de especie.

### **Descripción de características macroambientales y características de hospedero**

Inicialmente se procedió a la creación de una base de datos en QGIS (QGIS 2.18, Las Palmas), en la que se incluyó la información asociada a cada murciélago muestreado. Dicha base de datos incluyó campos numéricos para la inclusión de las coordenadas de cada sitio de muestreo en grados decimales (latitud y longitud), ocho dígitos (dos enteros y seis decimales) por variable. La ubicación geográfica de cada sitio de muestreo se determinó con un GPS (Marca GARMIN) ubicado en el punto central en donde se colocaron las cuatro redes de niebla. Además, se incluyeron como parte de la base de datos campos de texto de tamaño variable para la inserción de los datos correspondientes a las especies de murciélagos capturados, las características de hospedero (sexo, peso, grupo etario, condición reproductiva), la presencia/ausencia de hemoflagelados en sangre y el nombre del agente identificado en cada individuo.

Para la descripción de las características macroambientales de los sitios de captura se procedió a la creación de mapas en los que se sobrepuso los valores de la base de datos en

QGIS con las capas temáticas del Atlas Digital de Costa Rica (ITCR, 2014) de: Uso de suelo (ITCR, año: 2013, fuente: hojas 1:200000 de Sistema de clasificación: Soil Taxonomy, USDA); Cobertura vegetal (ITCR, año: 1998, fuente: hojas 1:200000 de Imágenes Landsat); Precipitación media (mm) (ITCR, año: 2011, fuente: hojas Atlas climatológico Instituto Meteorológico Nacional); y Temperatura media (°C) (ITCR, año: 2011, fuente: hojas Atlas climatológico Instituto Meteorológico Nacional).

La elección de capas se efectuó considerando las variables evaluadas por Rodríguez (2013), quien las seleccionó según la ecología de cada una de las especies de los murciélagos, para la confección de modelos de distribución de quirópteros en Costa Rica.

Todas las capas se proyectaron en Costa Rica CRTM05, datum WGS84, escala 1:200.000, con cobertura a nivel nacional (Atlas 2014), lo que obligó a colocar los datos de ubicación de los sitios de captura de los murciélagos en la misma proyección para permitir la sobreposición de las capas.

Con base en la escala de trabajo, la Unidad Mínima Cartografiable fue de 40 metros, calculada como:

$$\text{Mínima Unidad Cartografiable} = \text{LPV} \times \text{Escala}$$

$$\text{Mínima Unidad Cartografiable} = 0.2\text{mm} : 40 \text{ metros.}$$

Escala= 1cm: 200.000 cm

Lpv= Límite de percepción visual del ojo (0.2mm)

El área evaluada para la descripción de las características macroambientales correspondió a un área circular definida por un radio variable con punto central en cada uno de los sitios de captura. La medida del radio que limita el área de estudio se estimó según el ámbito de hogar de los murciélagos, establecido para cada género de murciélago en la literatura científica: radio de 5 km para el género *Artibeus* spp. (Morrison 1979), 1.0 km para el género *Glossophaga* spp.; 2.5 km para el género *Carollia* spp. (Bernard y Fenton 2003) y 1,0 km para el género *Sturnira* spp. (Loayza y Loiselle 2008).

Dichas áreas fueron sobrepuestas con las capas temáticas evaluadas, utilizando comandos de intersección de temas de la extensión geoprocesadora de QGIS y la extensión Spatial Analyst (Qgis 2.18, Las Palmas).

Cada sitio fue descrito por la combinación de las características macroambientales que lo representaron, de manera tal que la descripción de un sitio incluyó los valores promedio de temperatura, precipitación, cobertura y uso de suelo, según el valor predominante en el área evaluada (ITCR, 2014).

### **Análisis de datos**

La interpretación de los mapas se complementó con el análisis de regresión múltiple para eventos raros que evalúa la relación entre las características de hospedero (sexo, peso, grupo etario, condición reproductiva), las características macroambientales de los sitios de captura (variables independientes) y los hallazgos moleculares de presencia/ausencia de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. en las diferentes especies de murciélagos evaluados (variables dependientes). La regresión múltiple para eventos raros se realizó mediante la generación de Modelos Lineales Generalizados (GLM, por sus siglas en inglés), función Relogit. Dichos modelos permiten la selección y medición del tamaño del efecto o grado de afectación de las variables explicativas en presencia/ausencia de los parásitos en estudio. Para la selección del (de los) modelo (s) de mejor ajuste se utilizaron los criterios de información de Akaike (AIC) como medida de calidad y el Peso de Akaike como medida de selección del modelo de mejor aproximación. Todos los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del software R 3.2.0 (R Development Core Team 2016).

### **Resultados**

En las 11 localidades muestreadas se capturó un total de 194 murciélagos generalistas. De dichos murciélagos se logró obtener un total de 98 muestras de sangre de diferentes especies, en su mayoría, de los géneros *Carollia*, *Artibeus*, *Sturnira* y *Glossophaga* (cuadro 1.1).

**Cuadro 1.1** Especies de murciélagos muestreados en 11 sitios de las provincias de Limón, Heredia, Puntarenas, Guanacaste y Cartago de Costa Rica.

Sitio de recolección	Localidad	Ubicación	Especie capturada (número de individuos muestreados)
1	Finca Starke	Puerto Viejo de Sarapiquí, Heredia	<i>Carollia perspicillata</i> (2) <i>Carollia castanea</i> (1) <i>Carollia sowelli</i> (1) <i>Platyrrhinus. helleri</i> (1)
2	Pozo Azul	Puerto Viejo de Sarapiquí, Heredia	<i>Artibeus jamaicensis</i> (6) <i>Carollia sowelli</i> (3) <i>Sturnira lillium</i> (1)
3	P.N. Carara	Cantón Garabito, Puntarenas	<i>Artibeus jamaicensis</i> (5) <i>Artibeus lituratus</i> (1) <i>Carollia sowelli</i> (5) <i>Pteronotus parnelli</i> (2) <i>Tonatia silvícola</i> (1)
4	P. N. Barra Honda	Cantón de Nicoya, Guanacaste	<i>Artibeus jamaicensis</i> (1) <i>Centurio senex</i> (1) <i>Trachops cirrosus</i> (1) <i>Pteronotus parnelli</i> (12)
5	P. N Tapantí	Orosí, Cartago.	<i>Artibeus aztecus</i> (1)
6	P.N. Santa Rosa	Cantón de Liberia Guanacaste	<i>Carollia perspicillata</i> (5) <i>Carollia sowelli</i> (3)
7	Finca Corbana	Cantón de Guápiles, Limón.	<i>Carollia sowelli</i> (2) <i>Glossophaga soricina</i> (2)
8	Hacienda Navarro	Orosí, Cartago.	<i>Artibeus jamaicensis</i> (1) <i>Artibeus lituratus</i> (1) <i>Carollia sowelli</i> (4) <i>Glossophaga soricina</i> (2) <i>Sturnira lillium</i> (4) <i>Peropteryx kappleri</i> (1) <i>Pteronotus parnelli</i> (5)
9	Kekoldí Talamanca	Cantón de Talamanca, Limón	<i>Artibeus lituratus</i> (2) <i>Carollia sowelli</i> (4) <i>Dermanura</i> spp. (2)
10	Reserva Wagelia	Cantón de Turrialba, Cartago	<i>Carollia castanea</i> (4) <i>Carollia sowelli</i> (2) <i>Dermanura</i> spp. (2)
11	Hotel Ara Ambigua	La Virgen de Sarapiquí, Heredia	<i>Artibeus jamaicensis</i> (2) <i>Carollia perspicillata</i> (2) <i>Carollia castanea</i> (2) <i>Carollia sowelli</i> (1)

## Detección molecular de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. mediante PCR.

Se extrajo el ADN al total de las 98 muestras de sangre de murciélagos, los cuales fueron analizadas mediante pruebas de PCR específicas para el género *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. Se identificó *Leishmania* spp. en cuatro de las 98 muestras para una tasa de infección de 4.08%. El detalle de la especie, los sitios de captura y las características de los individuos determinados con *Leishmania* spp. se muestran en el cuadro 1.2.

**Cuadro 1.2** Especies de murciélagos, sitios de captura y características de los individuos positivos a *Leishmania* spp. mediante PCR.

Especie de murciélago	Sitio de captura	Resultado PCR (cebadores 13A y 13 B)	Sexo	Peso (g)	Grupo etario (juvenil/adulto)	Condición reproductiva
<i>Artibeus jamaicensis</i>	P.N. Barra Honda, Guanacaste	<i>Leishmania</i> spp.	Hembra	50	Adulto	Inactivo
<i>Artibeus lituratus</i>	Reserva Kékoldi, Talamanca Limón	<i>Leishmania</i> spp.	Hembra	34.5	Adulto	Activo
<i>Sturnira lillium</i>	Navarro-Orosí, Cartago	<i>Leishmania</i> spp.	Macho	22	Adulto	Activo
<i>Carollia castanea</i>	Waglelia Turrilaba, Cartago	<i>Leishmania</i> spp.	Hembra	13	Adulto	Inactivo

Del total de las 98 muestras de ADN de sangre de los murciélagos sometidas a la prueba de PCR anidada, para el género *Trypanosoma* spp. con el set de iniciadores S4 /S12 y S17/S18, se obtuvo un total de 9 (9.18%) muestras positivas a dicho agente. Los nombres de las especies, los sitios de captura y las características de los individuos que se determinaron con presencia de *Trypanosoma* spp. se detallan en el cuadro 1.3.

**Cuadro 1.3** Especies de murciélagos, sitios de captura y características de los individuos positivos a *Trypanosoma* spp. mediante PCR

Especie de murciélago	Sitio de captura	Resultado PCR (cebadores S4 y S12 B)	Sexo	Peso (g)	Grupo etario (juvenil/adulto)	Condición reproductiva
<i>Carollia perspicillata</i>	Finca Starke, Sarapiquí, Heredia	<i>Trypanosoma</i> spp.	Hembra	40	Adulto	Inactivo
<i>Artibeus jamaicensis</i>	Pozo Azul, Sarapiquí, Heredia	<i>Trypanosoma</i> spp.	Macho	49	Adulto	Inactivo
<i>Artibeus jamaicensis</i>	P.N. Carara, Puntarenas	<i>Trypanosoma</i> spp.	Hembra	48.5	Adulto	Inactivo
<i>Glossophaga soricina</i>	Guápiles, Limón	<i>Trypanosoma</i> spp.	Hembra	11	Adulto	Inactivo
<i>Carollia sowelli</i>	Reserva Kékoldi, Talamanca, Limón	<i>Trypanosoma</i> spp.	Hembra	18	Adulto	Activo
<i>Glossophaga soricina</i>	Navarro-Orosí, Cartago	<i>Trypanosoma</i> spp.	Macho	12	Adulto	Inactivo
<i>Carollia sowelli</i>	P.N. Carara, Puntarenas	<i>Trypanosoma</i> spp.	Hembra	18	Adulto	Inactivo
<i>Artibeus jamaicensis</i>	Finca Ara Ambigua, Sarapiquí, Heredia	<i>Trypanosoma</i> spp.	Hembra	48	Adulto	Activo
<i>Carollia sowelli</i>	Pozo Azul, Sarapiquí, Heredia	<i>Trypanosoma</i> spp.	Macho	20.5	Adulto	Inactivo

### Análisis moleculares específicos: secuenciación

De las nueve muestras positivas a *Trypanosoma* se logró identificar *Trypanosoma cruzi* en tres de las 98 analizadas (3.06%) y *Trypanosoma minasense*, en tres de las 98 analizadas (3.06%). En las tres restantes no se logró identificar la especie de tripanosomátido aislado, por lo que el resultado se muestra como *Trypanosoma* spp. En el cuadro 1.4 se

muestran las especies de murciélagos positivos a estos tripanosomátidos, así como los sitios de captura.

**Cuadro 1.4** Especies de murciélagos, sitios de captura y especie de tripanosomátido identificado mediante secuenciación.

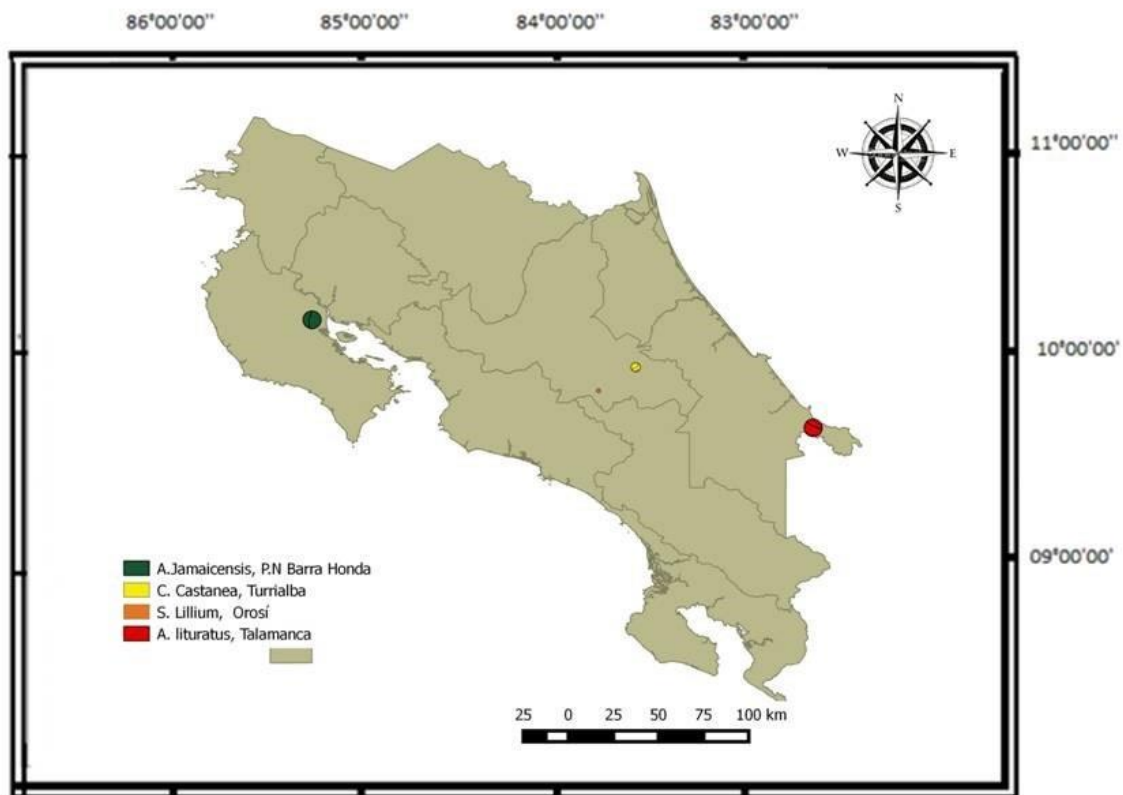
Especie de murciélago	Sitio de captura	Resultado secuenciación
<i>Carollia perspicillata</i>	Finca Starke, Sarapiquí, Heredia	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Artibeus jamaicensis</i>	Pozo Azul, Sarapiquí, Heredia	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Artibeus jamaicensis</i>	P.N. Carara, Puntarenas	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Glossophaga soricina</i>	Guápiles, Limón	<i>Trypanosoma minasense</i>
<i>Carollia sowelli</i>	Reserva Kékoldi, Talamanca	<i>Trypanosoma minasense</i>
<i>Glossophaga soricina</i>	Navarro-Orosí, Cartago	<i>Trypanosoma minasense</i>
<i>Carollia sowelli</i>	P.N. Carara, Puntarenas	<i>Trypanosoma</i> spp.
<i>Artibeus jamaicensis</i>	Ara Ambigua, Sarapiquí, Heredia	<i>Trypanosoma</i> spp.
<i>Carollia sowelli</i>	Pozo Azul, Sarapiquí, Heredia	<i>Trypanosoma</i> spp.

En el caso de las muestras positivas a *Leishmania* spp. no pudieron ser enviados a secuenciar dado que el producto amplificado por los primers utilizados fue de una longitud muy reducida (120pb).

### Descripción de características macroambientales y características del hospedero

Para la descripción de las características macroambientales de los sitios de captura de murciélagos con muestras de sangre positivas a *Leishmania* y *Trypanosoma* se generaron dos mapas en Qgis 2.4.0. (Figura 1.1 y Figura 1.2).

El primer mapa (Figura 1.1) muestra la distribución de las áreas de amortiguamiento anexa a cada punto en los que se detectó la presencia *Leishmania* spp. en murciélagos intersecadas con las capas de uso de suelo, cobertura vegetal precipitación media (mm) y temperatura media (°C), mediante la extensión geoprocesadora de Qgis.



**Figura 1.1** Distribución de ámbitos de hogar de murciélagos positivos a *Leishmania* spp.

Las características del hospedero y las características macroambientales del área asociada a cada muestra de sangre de murciélago positiva a *Leishmania* spp. se describen como casos numerados a continuación:

**Caso *Leishmania* 1.** Se detectó la presencia de *Leishmania* spp. en un murciélago de la especie *Artibeus jamaicensis*, adulto, hembra, inactivo, peso 50 g, capturado en el Parque Nacional Barra Honda, Nicoya Guanacaste. El ámbito de hogar se describe con cobertura vegetal forestal y uso de suelo de bosque secundario y tacotales, rodeados de charrales y pastos, una temperatura media anual mayor a los 28°C y precipitación media anual de 1500-2000mm.

**Caso *Leishmania* 2.** Se detectó la presencia de *Leishmania* spp. en un murciélago de la especie *Artibeus lituratus*, adulto, hembra, activo, peso 34.5 g, capturado en la Reserva



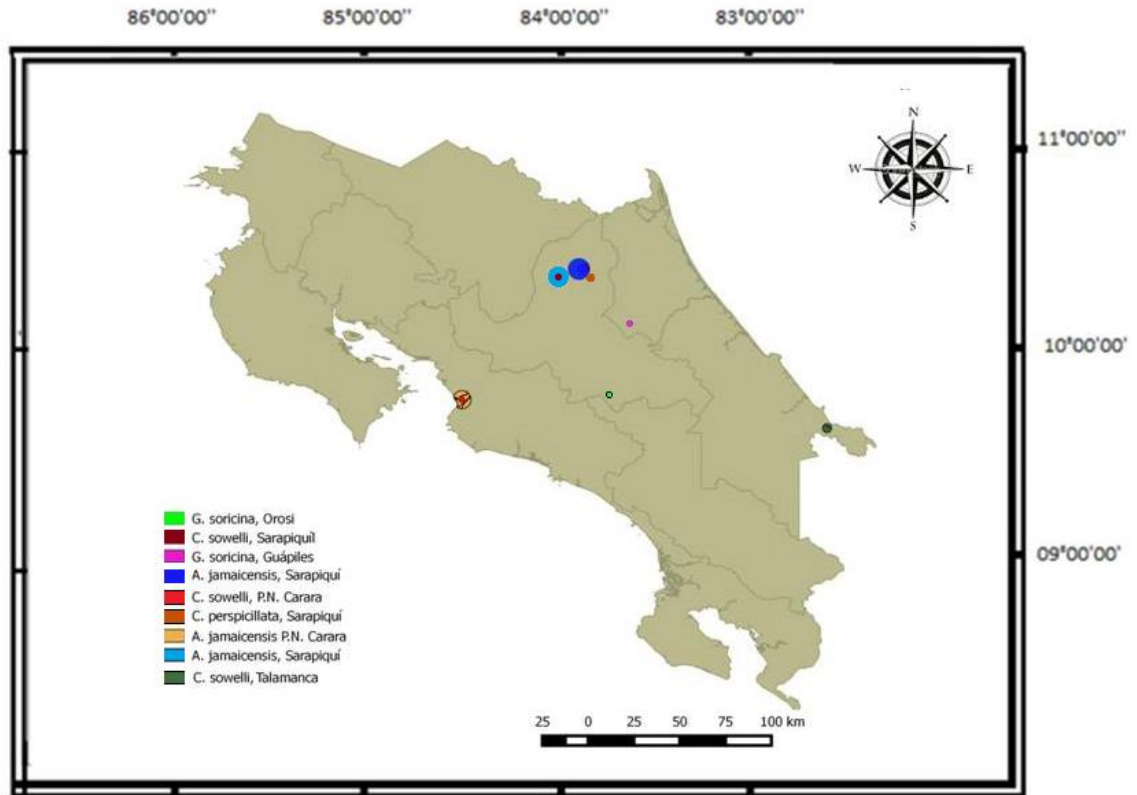
Kékoldi en Talamanca, Limón. El ámbito de hogar se describe con cobertura vegetal en su mayoría forestal con uso de suelo de bosque natural e intervenido, una temperatura media anual comprendida entre los 26 y los 28°C y precipitación media anual de 3000-4000 mm.

**Caso *Leishmania* 3.** Se detectó la presencia de *Leishmania* spp. en un murciélago de la especie *Sturnira lillium*, adulto, macho, activo, peso 22 g, capturada en la Finca Navarro en Orosí, Cartago. El ámbito de hogar se describe con cobertura de tipo forestal, agrícola y urbana, con cultivos permanentes de café y bosque secundarios, una temperatura media anual comprendida entre los 18 y los 20°C y precipitación media anual de 1500-2000 mm.

**Caso *Leishmania* 4.** Se detectó la presencia de *Leishmania* spp. en un murciélago de la especie *Carollia castanea*, adulto, hembra, inactivo, peso 13 g, capturada en la reserva Wagelia, Turrialba, Cartago. El ámbito de hogar se describe con cobertura vegetal en su mayoría de tipo forestal con uso de suelo de bosque natural y cultivos permanentes, una temperatura media anual comprendida entre los 18 y los 22°C y precipitación media anual de 3000-4000 mm.

El segundo mapa (Figura 1.2) muestra la distribución de las áreas de amortiguamiento anexa a cada punto en los que se detectó la presencia *Trypanosoma* spp. en murciélagos, intersecadas con las capas de uso de suelo, cobertura vegetal precipitación media (mm) y temperatura media (°C), mediante la extensión geoprocesadora de Qgis.

Las características del hospedero y las características macroambientales del área asociada a cada muestra de sangre de murciélago positiva *Trypanosoma* spp. se describen como casos numerados a continuación:



**Figura 1.2** Distribución de ámbito de hogar de los murciélagos positivos a *Trypanosoma* spp.

**Caso *Trypanosoma* 1.** Se detectó la presencia de *T. cruzi* en un murciélago de la especie *Carollia perspicillata*, adulto, hembra, inactivo, peso 40 g, capturado en Finca Starke, Puerto Viejo de Sarapiquí. El ámbito de hogar describe con cobertura vegetal de tipo forestal y uso de suelo de bosque secundario, una temperatura media anual comprendida entre los 24 y los 26°C y precipitación media anual de 3000-4000 mm.

**Caso *Trypanosoma* 2.** Se detectó la presencia de *T. cruzi* en un murciélago de la especie *Artibeus jamaicensis*, adulto, macho, inactivo, peso 49 g, capturado en la Reserva Pozo Azul, Puerto Viejo de Sarapiquí. El ámbito de hogar se describe con cobertura vegetal de tipo forestal y uso de suelo de bosque natural e intervenido, una temperatura media anual comprendida entre los 24 y los 26°C y precipitación media anual de 4000 mm.

**Caso Trypanosoma 3.** Se detectó la presencia de *T. cruzi* en un murciélago de la especie *Artibeus jamaicensis*, adulto, hembra, inactivo, peso 48.5 g, capturado en el Parque Nacional Carara, Puntarenas. El ámbito de hogar se describe con cobertura vegetal de tipo forestal y uso de suelo de bosque natural e intervenido, rodeado de zonas con pastos y cultivos, una temperatura media anual comprendida entre los 24 y los 28°C y precipitación media anual de 1500-3000 mm.

**Caso Trypanosoma 4.** Se detectó la presencia de *T. minasense* en un murciélago de la especie *Glossophaga soricina*, adulto, hembra, activa, peso 11.5 g, capturado en el Bananera Corbana, Guápiles. El ámbito de hogar se describe con cobertura vegetal de tipo y uso de suelo de, una temperatura media anual de 24°C y precipitación media anual de 3000- 4000 mm.

**Caso Trypanosoma 5.** Se detectó la presencia de *T. minasense* en un murciélago de la especie *Carollia sowelli*, adulto, hembra, inactiva, peso 18.5 g, capturado en la Reserva Kékoldi en Talamanca, Limón. El ámbito de hogar se describe con cobertura vegetal en su mayoría forestal con uso de suelo de bosque natural e intervenido, una temperatura media anual comprendida entre los 26 y los 28°C y precipitación media anual de 3000-4000 mm.

**Caso Trypanosoma 6.** Se detectó la presencia de *T. minasense*. en un murciélago de la especie *Glossophaga soricina*, adulto, hembra, inactivo, peso 12.5 g, capturado en la Finca Navarro en Orosí, Cartago. El ámbito de hogar se describe con cobertura de tipo forestal, agrícola y urbana, con cultivos permanentes de café y bosque secundarios, una temperatura media anual comprendida entre los 18 y los 20°C y precipitación media anual de 1500-2000 mm.

**Caso Trypanosoma 7.** Se detectó la presencia de *Trypanosoma* spp. en un murciélago de la especie *Carollia sowelli*, adulto, hembra, inactiva, peso 18 g, capturado en Parque Nacional Carara, Puntarenas. El ámbito de hogar se describe con cobertura vegetal de tipo forestal y uso de suelo de bosque natural e intervenido, una temperatura media anual comprendida entre los 24 y los 28 °C y precipitación media anual de 1500-3000 mm.

**Caso Trypanosoma 8.** Se detectó la presencia de *Trypanosoma* spp. en un murciélago de la especie *Artibeus jamaicensis*, adulto, hembra, inactivo, peso 48 g, capturado en la Finca

Ara Ambigua, Puerto Viejo de Sarapiquí. El ámbito de hogar se describe con cobertura vegetal heterogénea y uso de suelo que incluye bosque secundario, bosque intervenido, charrales y pastos, con una temperatura media anual comprendida entre los 24 y los 26°C y precipitación media anual de 4000 mm.

**Caso *Trypanosoma* 9.** Se detectó la presencia de *T. cruzi* en un murciélago de la especie *Carollia sowelli*, adulto, macho, inactivo, peso 20.5 g, capturado en la Reserva Pozo Azul, Puerto Viejo de Sarapiquí. El ámbito de hogar se describe con cobertura vegetal de tipo forestal y uso de suelo de bosque intervenido, una temperatura media anual comprendida entre los 24 y los 26 °C y precipitación media anual de 4000 mm.

### **Análisis de datos**

Del análisis de regresión múltiple para eventos raros se generó un total de 44 modelos estadísticos, 14 que relacionan las características de hospedero (sexo, peso, grupo etario, condición reproductiva) con los hallazgos moleculares de presencia/ausencia de *Leishmania* spp. (7) y *Trypanosoma* spp. (7) y los restantes 30 modelos evaluaron las relaciones entre las características macroambientales de los sitios de captura (variables independientes) y los hallazgos moleculares de presencia/ausencia de los agentes antes mencionados (15 modelos para cada agente).

En los siete modelos generados que evaluaron la relaciones entre las características de hospedero y la presencia de *Leishmania* spp. no se encontró una asociación fuerte entre la presencia de dicho agente y las variables de peso, sexo o estado reproductivo (Cuadro 1.5). El modelo de mejor aproximación mostró una relación débil entre el estado reproductivo y la presencia de la *Leishmania* spp. (AIC = 35.26, Peso Akaike 0.16), los modelos restantes mostraron relaciones muy débiles entre las variables evaluadas y la presencia de los parásitos de *Leishmania* spp. (Peso Akaike < 0.16).

**Cuadro 1.5.** Modelos de regresión logística para eventos raros que relacionaron las características de hospedero y la presencia/ausencia de *Leishmania* spp.

Modelo <sup>a</sup>	K <sup>b</sup>	AIC	AICc <sup>c</sup>	W <sub>I</sub> <sup>d</sup>
<b>Global (sexo + peso + estado)</b>	4	36.35	0.323	0.13
<b>Sexo</b>	2	35.86	0.006	0.15
<b>Estado reproductivo</b>	<b>2</b>	<b>35.26</b>	-	<b>0.16</b>
<b>peso</b>	<b>2</b>	36.12	0.009	0.15
<b>sexo + estado</b>	3	36.04	0.141	0.14
<b>estado + peso</b>	3	36.09	0.142	0.14
<b>sexo + peso</b>	3	36.40	0.145	0.14

<sup>a</sup> Parámetros del modelo, <sup>b</sup> Número de parámetros estimables en la aproximación del modelo, <sup>c</sup> Diferencia de valor entre AICc del modelo actual versus el modelo de mejor aproximación, <sup>d</sup> Peso Akaike.

De los siete modelos generados que evaluaron la relaciones entre las características de hospedero y la presencia de *Trypanosoma* spp. no se encontró una asociación fuerte entre la presencia de dicho agente y las variables del hospedero evaluadas (Cuadro 1.6)

**Cuadro 1.6.** Modelos de regresión logística para eventos raros que relacionaron las características de hospedero y la presencia/ausencia de *Trypanosoma* spp.

Modelo <sup>a</sup>	K <sup>b</sup>	AIC	AICc <sup>c</sup>	W <sub>I</sub> <sup>d</sup>
<b>Global (sexo + peso + estado)</b>	4	66.53	0.351	0.12
<b>Sexo</b>	2	63.67	0.002	0.15
<b>Estado reproductivo</b>	2	63.74	0.003	0.15
<b>peso</b>	<b>2</b>	<b>63.46</b>	-	<b>0.16</b>
<b>sexo + estado</b>	3	65.14	0.154	0.14
<b>estado + peso</b>	3	65.06	0.153	0.14
<b>sexo + peso</b>	3	64.97	0.152	0.14

<sup>a</sup> Parámetros del modelo, <sup>b</sup> Número de parámetros estimables en la aproximación del modelo, <sup>c</sup> Diferencia de valor entre AICc del modelo actual versus el modelo de mejor aproximación, <sup>d</sup> Peso Akaike.

El modelo de mejor aproximación mostró una débil relación entre el peso y la presencia de la *Trypanosoma* spp. (AIC = 63.46; Peso Akaike 0.16). Al igual que en el caso de *Leishmania* spp. en los modelos restantes la asociación entre las variables evaluadas y la presencia de los parásitos de *Trypanosoma* spp. fue muy débil (Peso Akaike < 0.16).

**Cuadro 1.7.** Modelos de regresión logística para eventos raros que relacionaron las características macroambientales y la presencia/ausencia de *Leishmania* spp.

Modelo <sup>a</sup>	K <sup>b</sup>	AIC	AICc <sup>c</sup>	W <sub>I</sub> <sup>d</sup>
<b>Global (temperatura + precipitación + cobertura + uso de suelo)</b>	6	67.57	0.943	0.05
<b>Temperatura</b>	2	64.03	0.040	0.08
<b>Precipitación</b>	<b>2</b>	<b>60.22</b>	<b>-</b>	<b>0.09</b>
<b>Cobertura</b>	2	64.04	0.040	0.08
<b>Uso de suelo</b>	3	66.01	0.197	0.07
<b>Temperatura + precipitación</b>	3	62.12	0.156	0.07
<b>Temperatura +cobertura</b>	3	66.03	0.198	0.07
<b>Temperatura + uso de suelo</b>	4	67.88	0.400	0.06
<b>Precipitación + cobertura</b>	3	62.13	0.156	0.07
<b>Precipitación + uso de suelo</b>	4	64.13	0.359	0.07
<b>Cobertura + uso de suelo</b>	4	67.99	0.401	0.06
<b>temperatura + precipitación + cobertura +</b>	4	64.11	0.359	0.07
<b>temperatura + precipitación + uso de suelo</b>	5	65.73	0.606	0.06
<b>temperatura + cobertura + uso de suelo</b>	5	69	0.642	0.06
<b>precipitación + cobertura + uso de suelo</b>	5	65.6	0.605	0.06

<sup>a</sup> Parámetros del modelo, <sup>b</sup> Número de parámetros estimables en la aproximación del modelo, <sup>c</sup> Diferencia de valor entre AICc del modelo actual versus el modelo de mejor aproximación, <sup>d</sup> Peso Akaike.

Al evaluar mediante 15 modelos la relaciones entre las características macroambientales y la presencia de *Leishmania* spp. no se encontró una asociación fuerte entre las variables de precipitación media, temperatura media, cobertura, uso de suelo y la presencia de dicho agente (Cuadro 1.7)

El modelo de mejor aproximación mostró una relación entre débil y moderada entre la precipitación media y la presencia de la *Leishmania* spp. (AIC = 60.22; Peso Akaike 0.09), los modelos restantes mostraron relaciones muy débiles entre las variables evaluadas y la presencia de *Leishmania* spp. (Peso Akaike < 0.09).

**Cuadro 1.8.** Modelos de regresión logística para eventos raros que relacionaron las características de hospedero y la presencia/ausencia de *Trypanosoma* spp.

<b>Modelo<sup>a</sup></b>	<b>K<sup>b</sup></b>	<b>AIC</b>	<b>AICc<sup>c</sup></b>	<b>W<sub>i</sub><sup>d</sup></b>
<b>Global (temperatura + precipitación + cobertura + uso de suelo)</b>	6	43.03	0.878	0.05
<b>Temperatura</b>	2	37.22	0.001	0.08
<b>Precipitación</b>	2	37.31	0.002	0.08
<b>Cobertura</b>	2	37.16	0.000	0.08
<b>Uso de suelo</b>	3	38.84	0.151	0.07
<b>Temperatura + precipitación</b>	3	39.13	0.154	0.07
<b>Temperatura +cobertura</b>	3	39.16	0.154	0.07
<b>Temperatura + uso de suelo</b>	4	67.88	0.643	0.06
<b>Precipitación + cobertura</b>	3	39.04	0.153	0.07
<b>Precipitación + uso de suelo</b>	4	40.79	0.351	0.07
<b>Cobertura + uso de suelo</b>	4	40.43	0.347	0.07
<b>temperatura + precipitación + cobertura +</b>	4	64.1	0.602	0.06
<b>temperatura + precipitación + uso de suelo</b>	5	41.03	0.581	0.06
<b>temperatura + cobertura + uso de suelo</b>	5	41.55	0.586	0.06
<b>precipitación + cobertura + uso de suelo</b>	5	42.14	0.593	0.06

<sup>a</sup> Parámetros del modelo, <sup>b</sup> Número de parámetros estimables en la aproximación del modelo, <sup>c</sup> Diferencia de valor entre AICc del modelo actual versus el modelo de mejor aproximación, <sup>d</sup> Peso Akaike.

Al evaluar mediante 15 modelos la relaciones entre las características macroambientales y la presencia de *Trypanosoma* spp. no se encontró una asociación fuerte entre las variables de precipitación media, temperatura media, cobertura, uso de suelo y la presencia de dicho agente (Cuadro 1.8)

Se obtuvo una relación débil entre las variables de precipitación media, temperatura media, cobertura y la presencia de *Trypanosoma* spp. (Peso Akaike 0.08), los modelos restantes mostraron escasas relaciones entre las variables evaluadas y la presencia de *Trypanosoma* spp. (Peso Akaike < 0.08).

## Discusión

En este estudio se reporta por primera vez la presencia de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. en murciélagos generalistas de Costa Rica. La tasa de infección con *Leishmania* spp. fue 4.1% (4/98) y *Trypanosoma* spp. 9.2% (9/98). La tasa de infección determinada para *Leishmania* es similar a lo reportado por Savani et al. (2010) en Brasil quienes determinaron una prevalencia de 3,66% de *Leishmania* en murciélagos, sin embargo resultó inferior al 9.09% y 8,87%, que se reportó en Venezuela (Lima et al. 2008) y México (Viquez-Rodríguez. 2015), respectivamente.

*A. jamaicensis*, *A. lituratus*, *C. castanea* y *S. lillium* fueron las especies encontradas con *Leishmania* spp. en el presente estudio. De ellas han sido reportadas anteriormente con *Leishmania* spp., *A. lituratus* en Brasil (Savani et al. 2010) y México (Berzunza-Cruz et al. 2015) y *A. jamaicensis* y *S. lillium* en México (Berzunza-Cruz et al. 2015), mientras que *C. castanea* se reporta por primera vez en estos mamíferos voladores, ya que no había sido documentado anteriormente.

La distribución geográfica de los murciélagos generalistas positivos con *Leishmania* spp. incluyó cuatro localidades, en tres provincias (Limón, Cartago y Guanacaste). Los hallazgos en Turrialba en la provincia de Cartago y Talamanca en Limón corresponden a zonas que se consideran endémicas para *Leishmania* spp. y en la que se distribuyen especies de flebótomos vectores transmisores de estos parásitos (Zeledón et al. 1985).

En el caso de los murciélagos de Orosí (provincia de Cartago) y P.N. Barra Honda (provincia de Guanacaste), fueron capturados en localidades que no se consideran endémicas para leishmaniasis. Sin embargo, el sitio de captura fue cercano a cuevas en rocas, biotopos que se consideran naturales para los flebótomos, y que cuentan con características climáticas similares a las zonas de distribución histórica de los vectores de la *Leishmania* (Zeledón et al. 1985), por lo que los quirópteros de estas áreas podrían estar co-habitando con mosquitos vectores de *Leishmania*.



La presencia de especies de mosquitos del género *Lutzomyia* spp. en sitios de refugio de diferentes especies de murciélagos como cuevas y grietas de rocas (Caraballo y Arrivillaga 2010), así como la preferencia alimenticia de los flebótomos por murciélagos ante la exposición experimental con otros mamíferos (Tesh *et al.* 1972, Lampo *et al.* 2000) ha sido demostrado previamente, por lo que se recomienda verificar la presencia de flebótomos en los sitios en los que se capturaron murciélagos infectados con *Leishmania* spp.

Los parásitos de *Leishmania* spp. encontrados en murciélagos en la Vertiente del Caribe no fueron identificados a nivel de especie, pero es probable que correspondan a *L. panamensis* o *L. braziliensis*, ya que que estos son los principales agentes etiológicos asociados a la leishmaniasis en Costa Rica (Peraza *et al.* 1998). Específicamente en las localidades de Turrialba y Talamanca se han reportado pacientes humanos con presencia de *L. panamensis*, por lo que es aún más probable que los aislamientos de *Leishmania* en murciélagos de dichos sitios correspondan a este agente etiológico (Peraza *et al.* 1998). En el caso del hallazgo de *Leishmania* en el murciélago *A. jamaicensis* del Parque Nacional Barra Honda, existe la posibilidad de que el agente etiológico implicado corresponda con *L. infantum*, el cual ha sido aislado en pacientes con leishmaniasis cutánea atípica en el norte de Guanacaste (Jaramillo-Antillón *et al.* 2009). Sin embargo, no se tiene reportes de presencia de *Lutzomyia longipalpis* en la zona geográfica en la que se capturó dicho murciélago.

En cuanto a las características de estos hospederos hubo un predominio de hembras infectadas, con respecto a machos infectados por hemoflagelados. Esto es coincidente con los datos reportados por Savani *et al.* (2010), quienes encontraron que la mayoría de individuos infectados con *Leishmania* fueron hembras y dedujeron que esto podría estar relacionado a que algunas especies viven en colonias de maternidad, en las cuales los machos generalmente se segregan y las hembras invierten mucha energía cuidando sus crías, por lo que son capturadas más fácilmente (Lima *et al.* 2008).

De los murciélagos positivos a *Leishmania* se encontró una hembra, adulta, activa de *A. lituratus* que mostró un peso de 35 g, muy inferior al promedio de peso para esta

especie (50g). Sin embargo, el presente estudio no permite explicar la diferencia entre el peso de este individuo con el peso promedio de otros individuos de esta especie. Los modelos estadísticos aplicados confirmaron que los datos obtenidos en la presente investigación no fueron suficientes para poder establecer una relación clara entre las variables de hospedero con la presencia de *Leishmania* spp. en las especies de murciélagos analizadas. Los pesos de Akaike con valores relativamente bajos indican que existe una probabilidad muy baja de que alguno de los modelos evaluados pueda explicar las relaciones existentes entre las características de hospedero y la presencia de los hemoflagelados en estudio. A pesar de ello, dado que los modelos de aproximación muestran relación del estado reproductivo, el peso y el sexo con la presencia de la *Leishmania*, se recomienda que para estudios futuros estas variables puedan ser consideradas como factores de hospedero relacionados con la presencia de estos hemoflagelados en murciélagos.

Por otra parte, los modelos que evaluaron las relaciones entre las características macroambientales de los sitios de captura con la presencia de *Leishmania* spp. en las especies de murciélagos muestreadas, no permiten establecer una relación clara entre las variables explicativas evaluadas y la variable respuesta. Los pesos de Akaike con valores muy bajos indican que existe una probabilidad muy reducida de que alguno de los modelos pueda explicar las relaciones existentes entre las características macroambientales y la presencia de murciélagos con hemoflagelados. Únicamente destaca una posible asociación entre la variable de precipitación y la presencia de *Leishmania* spp. en los quirópteros, la cual se podría atribuir a que en sitios con mayor precipitación se favorece la presencia de sitios de reproducción de los flebótomos vectores de dicho agente (Laneti 1984).

Con relación al 9,2% de tasa de infección con *Trypanosoma* spp. obtenida en la presente investigación, fue muy similar con el resultado de Cottontail y colaboradores (2009), quienes obtuvieron una prevalencia global de 10.2% en Panamá, aunque inferior a las prevalencias de 12,9% obtenidas en estudios en murciélagos de Brasil (Cavazzana et al. 2014), el 36.5% en Ecuador (Pinto et al. 2015), y el 61,2% de prevalencia en Colombia (Ramírez et al. 2014) y superior a la obtenida en México por Viquez-Rodríguez (2015), quien estableció una prevalencia de *T. cruzi* de apenas un 1,60% y el 2,6% obtenido por

Hodo et al. (2016) en Texas, USA. Es posible que la diferencia entre las prevalencias encontradas por los diferentes autores se deba a que los sitios de captura de los murciélagos en algunos casos incluyeron únicamente zonas endémicas de tripanosomiasis, mientras que en otras investigaciones, como el presente estudio, incluyeron tanto zonas endémicas como no endémicas.

La presente investigación reporta por primera vez la presencia de *T. minasense* y *T. cruzi* en murciélagos de nuestro país y a la vez representa la primera investigación que confirma los resultados mediante análisis genéticos (PCR y secuenciación). En cuanto a las especies detectadas con *T. cruzi* se incluyen *A. jamaicensis* y *C. perspicillata*. De ellas han sido reportadas anteriormente con presencia de este agente murciélagos *A. jamaicensis* en Panamá (Hoare, 1972, Cottontail et al. 2009, Cottontail et al. 2014) como otras especies de *Artibeus* de Colombia, Brasil y Ecuador (Cavazzana et al. 2014, Ramírez et al. 2014, Pinto et al. 2015) y *C. perspicillata* en Colombia y Brasil. (Cavazzana et al. 2014, Pinto et al. 2015).

El hallazgo de *T. minasense*, en quirópteros de las especies *G. soricina* y *C. sowelli* corresponde al primer reporte de tripanosomátidos en estos mamíferos voladores. *T. minasense* ha sido reportado en otras especies de mamíferos terrestres, dentro de los que destacan primates no humanos de la especie *Saimiri sciureus*, importados de Suramérica a Japón (Sato et al. 2008) y monos *Alouatta palliata* de Costa Rica (Chinchilla et al. 2005). *T. minasense* se considera un parásito inofensivo para los murciélagos ya que no se ha demostrado que afecte su salud y aún se desconocen los vectores de dicho microorganismo (Chinchilla 2005).

La distribución geográfica de los murciélagos generalistas positivos a *Trypanosoma* abarcó tanto sitios de la Vertiente del Pacífico como la del Caribe. Dos de los murciélagos con *T. cruzi* se capturaron en el cantón de Puerto Viejo de Sarapiquí, sitio en el cual se había reportado la presencia de *Triatoma dimidiata*, vector principal de *T. cruzi* en nuestro país. El otro murciélago encontrado con *T. cruzi* se capturó en el Parque Nacional Carara, zona en la cual, a pesar de que no se ha reportado *T. dimidiata*, posee las características

altitudinales y climáticas de precipitación y temperatura similares a los lugares de distribución de este hemíptero (Zeledón 1981). Sumado a ello, se ha demostrado que *T. dimidiata* habita en biotopos tales como cuevas de murciélagos, montículos de piedras y árboles huecos (Zeledón 1981), los cuales son coincidentes con los de las especies de quirópteros capturados en esta investigación (Laval y Rodríguez-Herrera 2002). Por tal razón, se debe verificar la presencia de *T. dimidiata* en las localidades en que se encontraron murciélagos positivos a *T. cruzi*.

Los hallazgos de *T. minasense* se registraron únicamente en la Vertiente del Caribe en las localidades de Orosí, Kékoldi en Talamanca y en la Finca Corbana en Guápiles, en la provincia de Limón. Aún cuando hay documentación de reportes de *T. minasense* en monos *A. palliata* de Costa Rica, Chinchilla y colaboradores (2005) no especificaron la ubicación geográfica de sus hallazgos, por lo que no es posible realizar comparaciones de distribución geográfica de este parásito en nuestro país.

En cuanto a las características de los murciélagos hospederos de *Trypanosoma*, el peso de los individuos positivos no mostró variaciones significativas con respecto a los no infectados, similar a los resultados obtenidos por Cottontail (2009) en Panamá quienes observaron que el peso de *A. jamaicensis* no era influenciado de forma significativa por la presencia de tripanosomas. Los modelos estadísticos aplicados no arrojaron una relación clara entre las variables de hospedero con la presencia de *Trypanosoma* spp. Los pesos de Akaike indicaron la existencia de una posible relación entre el peso de los murciélagos con la presencia de *Trypanosoma*, por lo que se recomienda considerar estudiar en el futuro esta variable como factor de hospedero relacionado a la presencia de hemoflagelados en mamíferos voladores. Para conocer mejor las interacciones parásito con hospedador será importante tomar en cuenta, para investigaciones futuras, estas y otras características del murciélago en relación a la presencia de los tripanosomátidos.

De igual manera, no se logró establecer una relación significativa entre las características macroambientales de los sitios de captura con la presencia de *Trypanosoma* spp. en las especies de mamíferos analizadas. Los pesos de Akaike con valores muy bajos

confirmaron la existencia de una probabilidad muy reducida de que alguno de los modelos pueda explicar las relaciones existentes entre las características macroambientales y la presencia de murciélagos con hemoflagelados.

Destaca que, en la presente investigación, ninguno de los animales mostró signos evidentes de enfermedad en el examen físico, lo cual concuerda con observaciones previas que han demostrado que la tasa de infección de los tripanosomátidos en estos animales es muy baja, por lo que se cree que la presencia de estos hemoparásitos podría no afectar la salud de estos mamíferos (Hoare 1972, Marinkelle 1977, Cottontail 2009). Sin embargo, dado el diseño de muestreo y la técnica de captura utilizada, la captura incluyó únicamente animales activos y por lo tanto es probable que las muestras correspondan únicamente a animales sanos.

A pesar de que se evaluaron zonas con bosque natural, con cobertura forestal de bosque continuo, todos los sitios de captura de murciélagos positivos a *Trypanosoma* y *Leishmania* correspondieron a lugares con cultivos o pequeños fragmentos de bosque secundario o alterado inmersos en una matriz de charrales, pastos, o uso urbano, lo cual es coincidente con los resultados de Cottontail et al. (2009) y Viquez-Rodríguez (2015), quienes han reportado tendencias de incidencia mayor de quirópteros con hemoflagelados en paisajes alterados o con altos grados de fragmentación. Los paisajes fragmentados se asocian con altas densidades de murciélagos generalistas y reducción de la diversidad de murciélagos (Fenton et al. 1992), lo que puede generar estrés, cambios hormonales y consecuente depresión del sistema inmune; y sumado a un mayor contacto con los vectores, aumenta las posibilidades de transmisión de tripanosomátidos entre huéspedes (Cottontail et al. 2009).

Dado el creciente impacto de presión e invasión antropogénica sobre los ecosistemas, y la complejidad de factores que intervienen en la presencia de *Leishmania* y *Trypanosoma* en murciélagos, es importante realizar estudios integrados de los hospederos, los vectores y el ambiente, con lo cual se pueda tener una mejor comprensión del efecto de la presencia de estos hemoparásitos en los murciélagos, las relaciones de los vectores de estos tripanosomátidos en estos mamíferos y el efecto de los cambios ecosistémicos que

pueden favorecer la aparición de enfermedades emergentes, esto no solo en pro del bienestar del ecosistema, sino también en pro de la salud humana y la conservación de los quirópteros.

Ante esto, se recomienda realizar nuevas investigaciones que examinen las características de hospedero y las características macroambientales de los sitios en donde se capturaron murciélagos con hemoflagelados, incluyendo un número mayor de individuos por especie y por sitio. Esto a fin de conocer las especies de hemoflagelados implicadas y describir los principales factores de hospedero y factores macroambientales asociados a la presencia de tripanosomátidos en los murciélagos de nuestro país.

## Caracterización molecular y análisis filogenéticos de hemoflagelados tripanosomátidos de murciélagos de Costa Rica.

### Resumen

Los tripanosomátidos tienen una gran variedad y complejidad genética. En murciélagos se han estudiado especies de tripanosomátidos pertenecientes a los subgéneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum* y *Megatrypanum*, pero la clasificación taxonómica y las relaciones filogenéticas son muy controversiales. El presente estudio caracteriza molecularmente tripanosomátidos encontrados en muestras de sangre de murciélagos de Costa Rica capturados en seis distintas localidades de cuatro provincias, entre junio 2013 y agosto 2014, y analiza las relaciones filogenéticas de los hemoparásitos encontrados con aquellas descritas por otros autores. Se analizó un total de seis secuencias mediante análisis de Neighbor-join, Máxima Verosimilitud y Máxima Parsimonia. Los resultados de los análisis del segmento de 480 pb del gen 18S ADNr de las muestras positivas por *Trypanosoma*, de las especies *Carollia perspicillata* (n=1) y *Artibeus jamaicensis* (n=2) mostraron 100-99% (442pb/442pb, 426pb/428pb, 432pb/433pb respectivamente) de identidad con *Trypanosoma cruzi* (GenBank CP015657) y muestras de *Glossophaga soricina* (n=2) y *Carollia sowelli* (n=1) un 99-100% (346pb/347pb, 348pb/348pb, 368pb/370pb respectivamente) de identidad con *Trypanosoma minasense* (GenBank AB362411). El hallazgo de *T. minasense* constituye el primer reporte de esta especie de tripanosomátidos en murciélagos en el continente americano. El árbol filogenético generado apoya la separación de *Trypanosoma minasense* subgénero *Megatrypanum* de *T. rangeli*, subgénero *Herpetosoma* y *T. cruzi*, subgénero *Schizotrypanum*, agentes asociados comúnmente con el grupo de los quirópteros. Sin embargo, dada la complejidad y controversia de clasificación taxonómica de *Trypanosoma*, se recomienda realizar mayor investigación que permita ampliar la gama de especies de tripanosomátidos de murciélagos de diferentes regiones y con ello entender la diversidad, la evolución, y los orígenes biogeográficos de los hemoflagelados en este grupo de mamíferos.

**Palabras clave:** análisis filogenético, Costa Rica, diversidad genética, Murciélagos, *Trypanosoma*.

## Molecular characterization and phylogenetic analysis of tripanosomatides hemoflagellates from bats of Costa Rica.

### Summary

Tripanosomatides has a great variety and genetic complexity. Studies about bats have included in subgenera *Herpetosoma*, *Schizotrypanum* and *Megatrypanum*, but Taxonomy and phylogeny are very controvertial. The present study on molecular characterizeation of tripanosomatides found in blood samples of bats. We captured the animals in six different locations from four provinces of Costa Rica between June 2013 and August 2014. We analyze the phylogenetic relationships beetwen the hemoflagellates founded in this survey and the reported in literature. Six sequences from the segment 480 bp of the gene 18S were analized by Neighbor-Join, Maximum Likelihood and Maximum Parsimony f-rom samples of *Carollia perspicillata* (n=1) and *Artibeus jamaicensis* (n=2) positive to *Trypanosoma cruzi* (GenBank CP015657) and samples from *Glossophaga soricina* (n=2) y *Carollia sowelli* (n=1) in 99-100% (346pb/347bp, 348pb/348bp, 368pb/370pb) matched with *Trypanosoma minasense* been the first report in bats. The phylogenetic tree support the separation of *T. minasense* subgenera *Megatrypanum* from *T. rangeli*, subgenera *Herpetosoma* and *T. cruzi*, subgenera *Schizotrypanum*, agents associated with chiropterans. Despite of the complexity and controversy of the Taxonomy of *Trypanosoma* it is recomendad that there is more research to increase tripanosomatides in bats from different regions. Future reseach will help us understand the diversity, evolution and the biogeographic origins of the hemoflagellates in this gropu of mammals.

**Key words:** bats, genetic diversity, *Trypanosoma*, phylogenetic analysis, Costa Rica.



## Introducción

Durante las últimas décadas, la secuenciación del genoma de los parásitos kinetoplástidos ha mostrado avances muy importantes, principalmente asociados a la implementación de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Tibayrenc 1998, Sánchez y Russomando 2012). La importancia de la caracterización molecular en la familia Trypanosomatidae radica en que, al igual que con la mayoría de otros organismos unicelulares, las relaciones evolutivas son muy imprecisas si se dispone únicamente de caracteres morfológicos para describir las relaciones dentro de esta familia. Por esta razón, la descripción molecular proporciona características adicionales para análisis filogenéticos que ayudan a entender las relaciones evolutivas del grupo (Hughes y Piontkivska 2003, Messenger et al. 2015, Tomasini y Diosque 2015).

La diversidad genética de *Trypanosoma* muestra una gran variedad y complejidad producto de una serie de eventos de recombinaciones durante numerosas generaciones y acumulaciones de mutaciones de manera estocástica (Tibayrenc et al. 1991). Conocer y caracterizar las cepas a nivel molecular ha sido y es fundamental para la comprensión de la epidemiología de las enfermedades asociadas a estos agentes parasitológicos (Tibayrenc 1998, Hughes y Piontkivska 2003, Cottontail et al. 2014). Por ende, diferentes investigadores han trabajado en la implementación de técnicas moleculares para lograr diagnósticos más precisos y un mejor entendimiento de la filogenia de los tripanosomátidos (Cottontail et al. 2014, Messenger et al. 2015, Tomasini y Diosque 2015).

El análisis de la taxonomía y las relaciones genéticas de los tripanosomátidos con el ancestro en común se realizó durante muchas décadas basados en la estructura física y la fisiología celular de estos protozoarios (Tibayrenc 1998). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el uso de técnicas moleculares para caracterizar los genes específicos de especies es necesario para comprender la historia evolutiva, los orígenes de los ciclos de vida y las enfermedades asociadas a este grupo de parásitos (Jackson 2015).

Conocer si las especies de tripanosomátidos están estrechamente relacionadas o no, tiene implicaciones importantes para la comprensión de la biología de estas especies y esto, a su vez, para poder desarrollar estrategias para la profilaxis y tratamiento de enfermedades asociadas a estos hemoflagelados (Hughes y Piontkivska 2003, Sánchez y Russomando 2012).

Entre las técnicas moleculares que se han utilizado para la identificación de linaje y sublinajes de los tripanosomátidos se encuentran la PCR y la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) (Sánchez y Russomando 2012, Izeta-Alberdi et al 2016). Mediante el uso de marcadores como el gen 18S ADNr, 24S ADNr y el gen mini-exón se identifican los parásitos directamente en las muestras biológicas, sin cultivo previo y es posible identificar unidades discretas de tipificación (DTU). Por tal razón, el uso de estos marcadores genéticos ha demostrado ser de gran valor en la investigación de la diversidad genética (Sánchez y Russomando 2012, Zingales et al., 2012).

El género *Trypanosoma* se ha clasificado en dos secciones: Stercoraria, transmitida por las heces del vector y Salivaria, que lo hace por la saliva del vector (Grisard 2002). La sección Stercoraria a su vez se ha dividido en tres subgéneros: Herpetosoma, en el que se clasificó tradicionalmente *T. rangeli* y *Trypanosoma lewisi* (Maia Da Silva et al. 2009); Megatrypanum, taxón en el que se ubica a *T. minasense* y Schizotrypanum, en el que se incluye *T. cruzi* (Hoare 1972).

Para *T. cruzi* se ha descrito previamente dos linajes filogenéticos importantes *T. cruzi* I (asociado al ciclo enzoótico) y *T. cruzi* II (asociado al ciclo doméstico) (Westenberger et al. 2005, Sánchez y Russomando 2012). Este último fue subdividido en cinco subgrupos, *T. cruzi* IIa, IIb, IIc, IId y IIE basados en marcadores moleculares como la región intergénica del gen miniexón y las subunidades ribosomales 18S y 24S $\alpha$  (Tibayrenc 1998). Posteriormente, fue dividido en siete linajes o unidades de tipificación discretas (DTU), denominados TcI-TcVI y Tcbat (Zingales et al. 2012) y la propuesta más reciente, basada en análisis filogenético multilocus, define tres linajes primarios, en el que linaje I incluye DTU I, el linaje II incluye DTU II y el linaje III incluye DTU III y IV; las DTU restantes, V y VI, no se han asignado a

linajes, pero muestran una aproximación con DTU II (Izeta-Alberdi et al 2016). A pesar de los esfuerzos de investigación realizados, la clasificación taxonómica de este género y grupos taxonómicos asociados es aún controversial (Cottontail et al. 2014, Izeta-Alberdi et al 2016).

Se considera que la diversidad genética de *T. cruzi* está asociada con huéspedes y ciclos de transmisión específicos (Zingales et al. 2012). Por ello, conocer la genética poblacional de *T. cruzi* es fundamental para entender el desplazamiento de estos parásitos dentro de los paisajes, cuya dinámica varía en función de la capacidad de dispersión e interacciones de los vectores y sus hospederos, y así conocer el riesgo de transmisión a humanos (Izeta-Alberdi et al 2016). En este sentido, es importante caracterizar *T. cruzi* a nivel de genotipos, para comprender la estructura de la población del parásito, la distribución geográfica de las principales cepas, los ciclos de transmisión y las manifestaciones clínicas de la enfermedad asociadas a cada uno de los genotipos (Arriagada-Martínez 2014)

En murciélagos se han estudiado especies de tripanosomátidos pertenecientes a los tres subgéneros. Existen informes de especies de *Herpetosoma* en los murciélagos de *T. lineatum* en Venezuela, *T. lewisi* en Puerto Rico, *Trypanosoma longiflagellum* en Irak y *Trypanosoma. aunauiwa* en Nueva Guinea (Ewers 1974, Marinkelle 1977).

En cuanto a análisis moleculares realizados en América Latina, destacan investigaciones como la de Maia Da Silva y colaboradores (2009) en Brasil, quienes mediante el análisis de secuencias de SSU ADN<sub>r</sub> reportaron la presencia de *T. rangeli* en muestras de sangre de *Platyrrhinus lineatus* y *Artibeus planirostris*, mostrando una clara separación filogenética de las cepas de *T. cruzi*, *T. marinkellei* y *T. dionisii* aisladas de murciélagos de la misma zona geográfica.

Por otra parte, en Panamá, Cottontail y colaboradores (2014), mediante el análisis filogenético de una subunidad del gen 18S ADN<sub>r</sub> de tripanosomátidos, identificaron cinco subespecies de *T. cruzi* en murciélagos *Artibeus jamaicensis*, demostrando la existencia de vacíos en el conocimiento de este grupo taxonómico en murciélagos (Cottontail et al. 2014).

En Costa Rica, únicamente el estudio de Zuriaga et al. (2012), ha caracterizado molecularmente secuencias del gen miniexón de cepas *T. cruzi*. Ellos realizaron un análisis de 16 muestras: tres aislamientos de humanos, uno de un perro, uno de un *Didelphis marsupialis* y 11 de hemípteros (nueve de *T. dimidiata*, un *Panstrongylus rufotuberculatus* y un *Rhodnius pallescens*), demostrando la existencia de dos haplotipos diferentes en nuestro país, los cuales están estrechamente relacionados con el grupo de haplotipos de Colombia y México.

En cuanto a murciélagos de Costa Rica, únicamente existen los reportes de *Trypanosoma vespetilionis* (Zeledón y Vieto 1957) y *Trypanosoma leonidasdeanei* (Zeledón y Rosabal 1969) en las especies *Glossophaga soricina* y *Saccopteryx bilineata* respectivamente. Sin embargo, hasta la fecha no se han aislado ni caracterizado molecularmente cepas de tripanosomátidos en este grupo de animales.

En el presente estudio se caracterizaron molecularmente los parásitos de *Trypanosoma* encontrados en murciélagos de nuestro país y se analizaron relaciones filogeográficas y filoespecíficas con cepas de tripanosomátidos descritas previamente.

## **Materiales y métodos**

### **Extracción, amplificación y secuenciación de muestras de ADN de murciélagos.**

Se incluyeron muestras de sangre de 98 murciélagos generalistas para determinar la presencia de tripanosomátidos. La extracción de ADN de la sangre de los murciélagos se efectuó mediante la utilización del kit comercial QIAGEN, QIAamp<sup>®</sup> DNA Investigator (QIAGEN, Crawley, UK), siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial. Se realizó un PCR anidado utilizando dos sets de primers según protocolo descrito por Savani et al (2005). El primer set de primers, S4 (5'-GAT CCA GCT GCA GGT TCA CC- 3') y S12 (5'-GGT TGA TTC CGT CCA CGG AC- 3'), amplificó un segmento de 540pb del gen 18S

ADNr, mientras que el segundo set de primers, S17 (5'-CCA AGC TGC CCA GTA GAAT-3') y S18 (5'-TCG GGC GGA TAA AAC ACC-3'), amplificó un segmento de 480 pb de mismo gen. La reacción de PCR para el primer set de primers (S4 y S12) se inició con un paso de desnaturalización de 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos con los siguientes parámetros: 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min y una incubación final a 72°C por siete minutos (Savani et al. 2005). Posteriormente, para la segunda reacción de PCR con los primers S17 y S18, se tomó un microlitro del producto de PCR generado con los primers S4 y S12, el cual fue desnaturalizado a 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos con los siguientes parámetros: 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 30 segundos (Savani et al. 2005). Como control positivo se utilizó una muestra de ADN de *T. cruzi* donada por el Laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. En el caso del control negativo se utilizó agua.

La separación de los productos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, en TBE 1X (Tris Base, ácido bórico, EDTA, pH8, 0,5 M) teñidos con Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain, corridos a 90 V durante 30 minutos y la visualización de los productos amplificados se efectuó en un transiluminador UV BioDoc-it Imagine System. El tamaño de las bandas se estimó con el marcador de peso molecular GenRuler 100 pb DNA ladder Plus (Fermentas®). Muestras que mostraron banda de tamaños 540 y 480 pbse consideraron positivas a tripanosomátidos. Posteriormente, seis de los productos de PCR fueron enviados a secuenciar a MACROGEN®, Corea, con el fin de confirmar los resultados e identificar el agente a nivel de especie.

### **Análisis filogenéticos**

Las secuencias obtenidas fueron editadas mediante el programa BIOEDIT 7.2.5 y se refinaron manualmente. Una vez editadas las secuencias, se realizó una revisión en BLAST para comparar productos obtenidos con las secuencias descritas en el GenBank. Posterior a ello, se elaboró un árbol filogenético con las muestras resultantes con presencia de tripanosomátidos y secuencias de tripanosomátidos emparentados obtenidas del GenBank. Para ello se realizaron los alineamientos correspondientes utilizando MUSCLE y

posteriormente se realizaron los análisis filogeográficos y filoespecíficos mediante modelos de secuencias de evolución de Máxima Verosimilitud (Maximun Likelihood) y métodos bayesianos. Las secuencias de referencia extraídas de GenBank fueron las siguientes: *T. cruzi marinkellei* (GenBank: FJ001664); *T. cruzi marinkellei* (GenBank: AJ009150); *T. minasense* (GenBank: AB362411); *Trypanosoma rotatorium* (GenBank: AJ009161); *Trypanosoma mega* (GenBank: AJ009157); *T. cruzi* SylvioX/10 (GenBank: CP015657); *T. brucei* (GenBank: AJ009141); *T. rangeli* (GenBank: AJ009160); *T. rangeli* (GenBank: AJ012413); *T. cruzi* (GenBank: AJ009147); *T. evansi* (GenBank: AJ009154).

Se utilizó *Trypanosoma borrelli* (GenBank: L14840) como Out-group. Los análisis de secuencias, la construcción de árboles filogenéticos y las mediciones de distancia genética se realizaron mediante el software MEGA, versión 7.0.

## Resultados

Del total de 98 muestras analizadas, se identificaron nueve positivas en PCR. Los resultados del segmento de 480 pb del gen 18S ADNr de las seis muestras positivas enviadas a secuenciación determinó tres (8-Sk, 26-Pa y 46-Pca) como *Trypanosoma*, mostrando un 99-100% (442pb/442pb, 426pb/428pb, 432pb/433pb respectivamente) de identidad nucleotídica con *T. cruzi* (**GenBank CP015657**) y dos muestras (87-Co y 157-Oro) con un 99% (346pb/347bp, 368pb/370pb) de identidad nucleotídica con *T. minasense* (GenBank **AB362411**). En una muestra de sangre (92-Ke) de *Carollia sowelli* se determinaron dos secuencias, una 100% idéntica (348pb/348bp) con *T. minasense* (**GenBank AB362411**) y otra con 98% de identidad nucleotídica (413pb/421pb) con *T. wauwau* (KR653211), por lo que se determina como sospechosa para presencia mixta de protozoarios. En el cuadro 2.1 se muestra el detalle de los resultados (especies de murciélago, sitios de captura, tripanosomátido identificado según secuencia más cercana en GenBank y porcentaje de similitud).

**Cuadro 2.1** Especies de tripanosomátidos identificadas mediante secuenciación según especies de murciélagos, sitios de captura y porcentaje de similitud con secuencia de GenBank más cercana.

Código	Especie de murciélago	Ubicación	Identificación	Secuencia más cercana GenBank	%Similitud / Alineamiento
8-Sk	<i>Carollia perspicillata</i>	Finca Starke, Sarapiquí	<i>Trypanosoma cruzi</i>	CP015657	100/100
26- Pa	<i>Artibeus jamaicensis</i>	Pozo Azul, Sarapiquí	<i>Trypanosoma cruzi</i>	CP015657	100/99
46-Pca	<i>Artibeus jamaicensis</i>	P.N. Carara, Puntarenas	<i>Trypanosoma cruzi</i>	CP015657	98/100
87-Co	<i>Glossophaga soricina</i>	Guápiles, Limón	<i>Trypanosoma minasense</i>	AB362411	99/100
92-Sk	<i>Carollia sowelli</i>	Reserva Kékoldi,	<i>Trypanosoma minasense</i>	AB362411	100/99
		Talamanca	<i>Trypanosoma wauwau</i>	KR653211	98/100
157-Oro	<i>Glossophaga soricina</i>	Navarro-Orosí, Cartago	<i>Trypanosoma minasense</i>	AB362411	99/100

En la figura 2.1 se muestra el análisis filogenético de la región del gen 18s ADN<sub>r</sub>, con el fin de dilucidar las relaciones entre las diferentes especies de *Trypanosoma*. Se aplicó el análisis con Bootstrap (BS), conocido como remuestreo con 1000 réplicas descrito por Efron (1979). Los valores de remuestreo al inicio de cada brazo muestran las estimaciones de confianza de separación o asociación de las diferentes secuencias incluidas en el árbol filogenético.

El árbol filogenético muestra las secuencias de especies asociadas a los diferentes clados que conforman el género *Trypanosoma*, definiendo una clara separación entre los clados *brucei* y *cruzi*, así como una clara separación con la especie utilizada como outgroup.

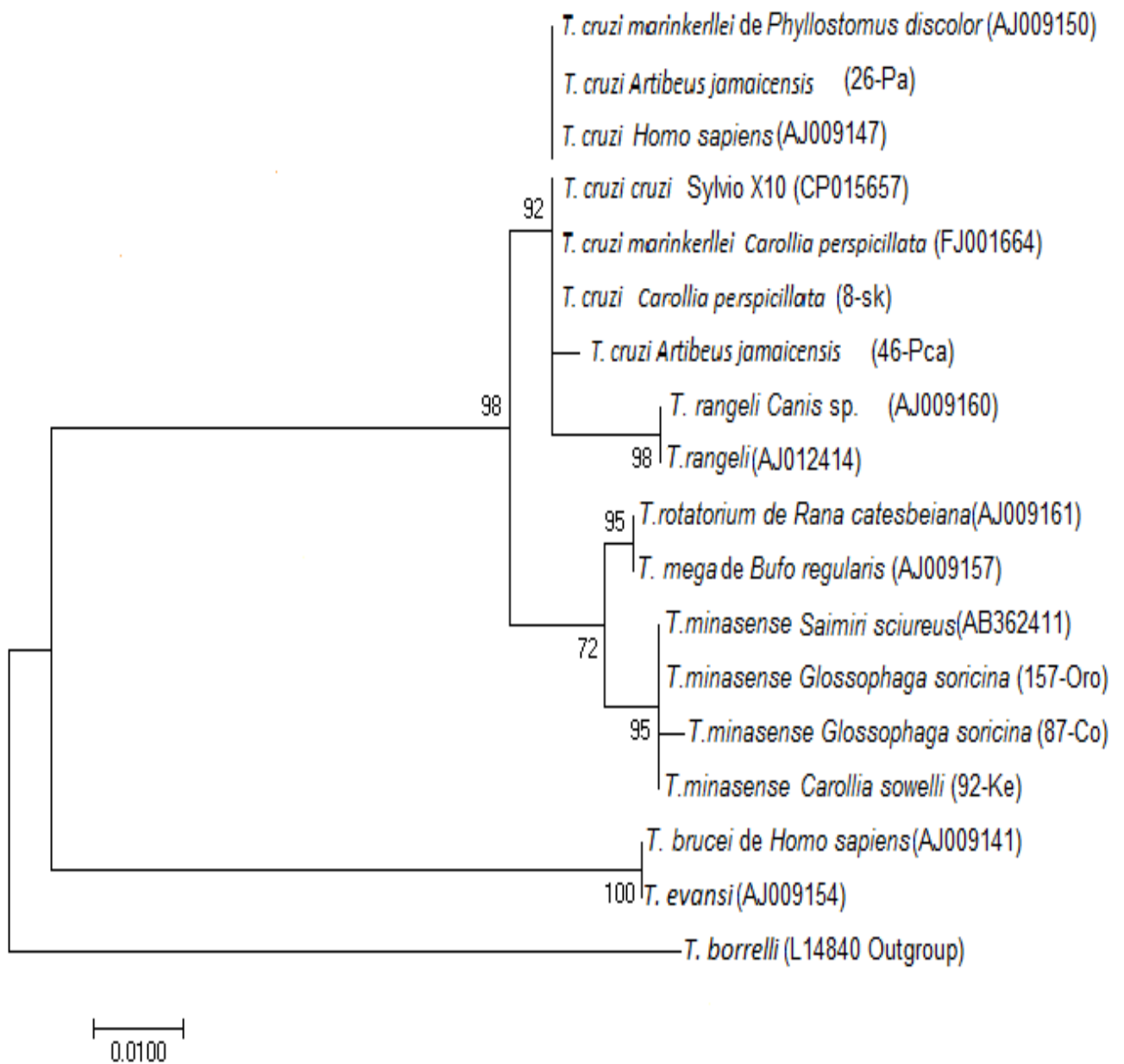
El clado *brucei* contiene especies del subgénero *Trypanozoon*: *T. evansi* y *T. brucei* claramente separadas entre sí (Bootstrap 100%). Por otra parte, se presentan las especies del subgénero *Schizotrypanum*, como *T. cruzi*, *T. c. marinkellei*; secuencias de *T. (Herpetosoma) rangeli* y clados menores claramente separados de tripanosomas asociadas a anfibios (*T. mega* y *T. rotatorium*) y de especies asociadas al subgénero *Megatrypanum* (bootstrap 98%).

Las tres muestras que se establecieron como *T. cruzi*, incluyendo las secuencias de los murciélagos de las especies *Carollia perspicillata* (8-Sk) y *Artibeus jamaicensis* (26-Pa y 46-Pca) descritas en el presente estudio, forman un grupo homogéneo junto con *T. cruzi marinkellei*, con una separación clara de los demás taxones, con un alto grado de homogeneidad genética dentro del grupo.

Otras tres secuencias de *Trypanosoma* obtenidas de los murciélagos *Glossophaga soricina* (87-Co y 157-Oro) y *Carollia sowellii* (92-ke), e identificadas como *T. minasense*, se determinaron estrechamente relacionadas con la secuencia *T. minasense*, (GenBank: AB362411) subgénero *Megatrypanum* conformando un grupo monofilético claramente separado de las otras especies de tripanosomátidos evaluadas.

Los resultados de los análisis de Máxima verosimilitud fueron apoyados por análisis de Máxima Parsimonia y Neighbor-joining (vecino más cercano). Las posiciones y el orden de ramificación de todos taxones principales se mostraron muy similares en tres métodos, presentando únicamente variaciones menores.





**Figura 2.1** Árbol filogenético generado para las secuencias amplificadas con la región 18S ADNr por Máxima Verosimilitud. El análisis de remuestreo (1000 réplicas) está representado en porcentajes en cada uno de los nodos.

## Discusión

El análisis molecular y filogenético realizado en el presente estudio confirman la presencia de *T. cruzi*, en murciélagos *Carollia perspicillata* y *Artibeus jamaicensis* y la presencia de *T. minasense* en *Glossophaga soricina* y *Carollia sowelli*, tripanosomátidos clasificados dentro los grupos Schizotrypanum y Megatrypanum respectivamente, subgéneros que han sido reportado previamente en quirópteros (Molyneux, 1991, Marcili et al. 2009, Cavazzana et al. 2010). Sin embargo, el presente estudio constituye el primer reporte de la presencia de *T. minasense* en mamíferos voladores del Continente Americano y el primer reporte de la presencia de *T. cruzi* en murciélagos de Costa Rica.

De la muestra denominada 92-Ke correspondiente a un murciélago *Carollia sowelli*, capturado en la Finca Kékoldi, en Talamanca, se obtuvieron dos secuencias moleculares distintas, por lo que se anota como sospechosa de presencia mixta de protozoarios (*T. minasense* y *T. wauwau*). Sin embargo, no fue posible verificar si corresponde a una presencia mixta de tripanosomátidos, ya que a pesar de que la herramienta BLAST determina una de las secuencias como *T. wauwau*, el porcentaje de similitud resultante es similar al obtenido con otras especies de *Trypanosoma*. Ante esto, se requiere de análisis de otras secciones del gen 18S o el análisis de otros genes para la determinación exacta de los agentes implicados.

El análisis del gen 18S ADNr ha demostrado ser un marcador útil para identificar linajes asociados a tripanosomátidos, dada la disponibilidad de secuencias en las bases de datos de estudios filogenéticos previos y la facilidad de obtener secuencias incluso directamente a partir de tejidos del huésped (Stevens et al. 1999a, Cavazzana et al. 2010). La colocación de pequeños fragmentos, junto con taxones de referencia que tienen secuencias más largas de este gen genera relaciones filogenéticas, que pueden ser complementadas con el análisis de secuencias de otros genes (Pinto et al. 2012).

El árbol filogenético generado en el presente estudio, demostró ser robusto en cuanto a separación de clados taxonómicos y su estructura fue semejante a la presentada por Stevens et al. (1998, 1999a). La clara separación entre los clados brucei y cruzi es

discutida por Stevens et al. (1998), y atribuida a una evolución temprana de este grupo, posiblemente asociada con la separación del supercontinente, millones de años atrás. El clado brucei contiene especies claramente separadas entre sí (Bootstrap 100%). Dichas especies pertenecen al subgénero *Trypanozoon*: *T. evansi* y *T. brucei*, las cuales son tripanosomas asociadas con mamíferos africanos. (Stevens et al. 1999a). Por otra parte, se encuentran claramente separados, las especies de tripanosomas *T. mega* y *T. rotatorium* las cuales se han asociado a anfibios y reptiles africanos (Stevens et al. 1999b, Lima et al. 2015).

*Trypanosoma rangeli*, un tripanosomátido americano de mamíferos silvestres, y transmitido por insectos triatomíneos, muestra asociación con el clado de *T. cruzi* y otras especies de *Schizotrypanum* restringidas a murciélagos y otros mamíferos sudamericanos, lo cual es concordante con las filogenias descritas por Stevens et al. (1999b), y Maia da Silva et al. (2009). Así mismo muestra una separación clara (Bootstrap 98%) con las secuencias identificadas como *T. minasense*, con lo cual se refuerza la hipótesis de la separación entre *T. rangeli*, subgénero *Herpetosoma* y las especies asociadas al subgénero *Megatrypanum* (Stevens et al. 1999b, Da Silva et al. 2007, Sato et al. 2008).

Por otra parte, asociado al clado *T. cruzi*, están especies del subgénero *Schizotrypanum*, como *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei*; con separación clara de los demás taxones, y sin una diferenciación dentro del grupo, dado el alto grado de similitud genética entre *T. cruzi* y los tripanosomátidos de murciélagos, la cual ha sido reconocida por varios autores en los últimos años (Da Silva et al. 2009, Franzén et al. 2012).

Las secuencias de *T. cruzi* encontradas en los murciélagos de las especies *Carollia perspicillata* y *Artibeus jamaicensis* descritas en el presente estudio, se ubican formando un grupo homogéneo con otras secuencias de *T. cruzi* y con la subespecie *Trypanosoma cruzi marinkellei*. Se asocia a *T. cruzi* de murciélagos de Costa Rica con secuencias de *T. cruzi* aisladas de humanos infectados residentes de Brasil y dos secuencias de *T. cruzi marinkellei* aisladas de murciélagos *Phyllostomus discolor* y *Carollia perspicillata* de la amazonía brasileña. Esto indica que las cepas de nuestro país probablemente tengan un ancestro en común con las cepas suramericanas.

La comparación de las secuencias de *T. cruzi* aisladas de murciélagos de nuestro país se asociaron con *T. cruzi* Sylvio X10, una cepa ampliamente estudiada y caracterizada, que corresponde al linaje enzoótico TCI, la cual afecta a humanos y se reporta como el genotipo más abundante y ampliamente distribuido en América (Arriagada-Martínez 2014). Dicha cepa muestra una gran similitud con *T.c marinkellei*, la cual muestra un genoma 11% menor que el del parásito de origen humano (Franzén et al. 2012). Las variaciones en las secuencias y la diferenciación entre genes de ambas cepas reflejan las trayectorias evolutivas de *T. cruzi* y por ende deben ser objetivos de investigaciones futuras.

Cabe destacar que las secuencias identificadas como *T. cruzi* en los tres murciélagos mostraron diferencia nucleotídica de 2 pb. entre los murciélagos *Carollia perspicillata* y *Artibeus jamaicensis* ubicados en la Vertiente del Caribe, y el *Artibeus jamaicensis* de la Vertiente del Pacífico. Ante esto, es necesario analizar una cantidad más grande de muestras y analizar otros genes (ejemplo Citocromo B), para establecer un grado de separación genética (Córdoba 2007). Estudios comparativos de *T. cruzi* de murciélagos de diferentes zonas geográficas pueden ser útiles para la comprensión de las relaciones huésped-parásito de las especies de Schizotrypanum (Marcili et al. 2009).

Las secuencias restantes, identificadas como *T. minasense*, se encontraron estrechamente relacionadas con la secuencia de *T. minasense*, aislada en monos ardilla (*Saimiri sciureus*) en cautiverio en Japón y secuencias descritas en Suramérica. Dicha especie ha sido relacionada con *Trypanosoma devei* y *Trypanosoma lambrecthi*, las cuales son especies de tripanosomátidos que se han registrado en primates no humanos neotropicales (Sato et al. 2008). Hasta la fecha, en nuestro país, *T. minasense* ha sido reportado únicamente en monos congo (*Alouatta palliata*), sin embargo, la identificación de este tripanosomátido se realizó por medio de características morfológicas. No existen secuencias publicadas, ni análisis filogenéticos que hagan referencia a *T. minasense* en Costa Rica (Chinchilla et al. 2005). Así mismo, las secuencias de *T. minasense* encontradas en un *Glossophaga soricina* de Orosí muestra una diferenciación nucleotídica de 2 pb. con un murciélago de la misma especie capturado en finca Corbana, en Guápiles y un *Carollia. sowelli* de Talamanca, por lo que se recomienda realizar estudios que analicen otros genes.

Asociado al grupo de secuencias de *T. minasense* se posicionan como grupos hermanos los clados menores *T. mega* y *T. rotatorium*, lo cual es coincidente con las observaciones de Hoare (1972), quien afirma que Megatrypanum es un subgénero heterogéneo de tripanosomas de mamíferos, que muestra afinidades con tripanosomátidos de anfibios y reptiles.

Los análisis moleculares efectuados demuestran la existencia de dos especies de *Trypanosoma* claramente diferenciadas en nuestro país, las cuales probablemente tengan un origen común con las especies de tripanosomátidos encontradas en murciélagos suramericanos, presentando pequeñas variaciones genéticas, las cuales podrían estar asociadas a diferentes procesos evolutivos generados a través del tiempo, lo cual debe ser confirmado con estudios futuros.

Se recomienda continuar realizando investigación para ampliar el conocimiento de las especies de tripanosomas presentes en murciélagos, y con ello lograr entender la diversidad, la evolución y los orígenes biogeográficos de los hemoflagelados en los quirópteros de las diferentes regiones del Continente Americano, a fin de conocer la importancia de esta diferenciación y evolución en la ecología de los parásitos, huéspedes y reservorios de estos microorganismos y posteriormente evaluar las posibles implicaciones para la salud humana.

## Conclusiones

Este es el primer estudio que reporta la identificación, caracterización molecular y análisis filogenético de los tripanosomátidos de murciélagos de nuestro país, lo cual servirá como línea base para el planteamiento y análisis de estudios posteriores que analicen molecularmente este grupo de hemoparásitos en quirópteros y otros mamíferos hospederos de los protozoarios estudiados. Se reporta por primera vez la presencia de *Leishmania* spp., *T. minasense* y *T. cruzi* en murciélagos de nuestro país y a la vez representa la primera investigación que confirma los hallazgos genéticos mediante la PCR y la secuenciación.

El hallazgo de *T. minasense* en las especies *G. soricina* y *C. sowelli* constituye el primer reporte de este tripanosomátido en mamíferos voladores del Continente Americano y su análisis molecular corresponde a la primera caracterización genética de dicho agente en nuestro país.

La presente investigación no logró establecer una relación clara entre las variables de hospedero con la presencia de *Trypanosoma* spp. y *Leishmania* spp., pero indican que existe una posible relación entre el peso y el estado reproductivo de los murciélagos encontrados con tripanosomátidos, por lo que se recomienda que estas variables sean investigadas en estudios futuros. De igual manera, aunque no se comprobó una relación significativa de los tripanosomatidos en murciélagos con las características macroambientales evaluadas, las variables de cobertura, precipitación y temperatura deben ser evaluadas en estudios posteriores a fin de establecer el efecto que puedan generar sobre la presencia de hemoflagelados en los quiróteros.

Los resultados de los análisis moleculares demuestran la existencia de dos especies de *Trypanosoma* claramente diferenciadas en nuestro país, las cuales probablemente tengan un origen en común con las especies de tripanosomátidos encontradas en murciélagos suramericanos. Sin embargo, es importante mencionar que el hallazgo de presencia de estos tripanosomátidos en quirópteros no implica que las especies estudiadas sean reservorios de hemoflagelados, ni se demuestra que tengan participación en el ciclo de transmisión de la leishmaniasis o el mal de Chagas.

## **Recomendaciones**

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología y Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Costa Rica seguir incluyendo ciencias interdisciplinarias como la Medicina de la Conservación dentro de las áreas prioritarias de investigación, con el fin de que se continúe realizando investigación científica de manera integrada.

Seguir estudiando enfermedades tropicales infecciosas y parasitarias y su relación con sus hospederos, a fin de conocer las posibles variaciones epidemiológicas debidas a los cambios ecosistémicos provocados por acción humana y el efecto que se podría estar generando sobre la salud pública.

A la comunidad científica y estudiantes que deseen investigar las posibles interacciones entre los tripanosomátidos y los quirópteros de nuestro país, que incluyan la captura de vectores en sus diseños de muestreo, así como la captura de animales enfermos, la toma de datos de características macroambientales y ecológicas en cada uno de los sitios de muestreo.

Así mismo, a quienes deseen realizar investigaciones de caracterización molecular y filogenéticas, se les recomienda incluir el análisis de diferentes marcadores moleculares. Esto a fin de contar con mayor información que permita distinguir entre las diferentes unidades discretas de tipificación y establecer relaciones filogenéticas confiables y con mayor apoyo científico.

Manejar la información generada con mucha cautela y discreción a fin de evitar alarmar a la población humana ante el hallazgo de tripanosomátidos en estos mamíferos. En caso de comunicar los resultados, se debe dejar en claro que el hallazgo de presencia de estos tripanosomátidos en quirópteros no implica que las especies estudiadas tengan participación en el ciclo de transmisión de la leishmaniasis o el mal de Chagas.

## Referencias bibliográficas

- Arriagada Martínez, K. E. 2014. Tipificación de linajes de *Trypanosoma cruzi* en individuos con enfermedad de Chagas cardiópatas y no cardiópatas. Tesis Profesional de Médico Veterinario Departamento de Medicina Preventiva Animal. Universidad de Chile.
- Allan, B. F., Keesing, F. & Ostfeld, R. S. 2003. Effect of forest fragmentation on Lyme disease risk. *Conservation Biology* 17, 267–272.
- Bernard, E. & Fenton, M.B. 2003. Bat mobility and roosts in a fragmented landscape in Central Amazonia, Brazil. *Biotropica* 35, 262–277.
- Barnabe C. Brisse M & M. Tibayrenc. 2003. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses *Infection. Genetics and Evolution* 2, 201-208.
- Berzunza-Cruz, M., Rodríguez-Moreno, Á., Gutiérrez-Granados, G., González-Salazar, C., Stephens, C. R., Hidalgo-Mihart, M.,... & Ibarra-Cerdeña, C. N. 2015. *Leishmania* (L.) *mexicana* infected bats in Mexico: novel potential reservoirs. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(1), e0003438.
- Breniere, S.F. y Waleckx, E. 2009. Epidemiología molecular y genética evolutiva de los patógenos: enfoque específico en los agentes de la enfermedad de Chagas y de las Leishmaniasis. En: Corredor-Pereira, C (Eds.). *Tendencias y futuro de la investigación en parasitología y en productos naturales. Memorias del Seminario Internacional ACOFACIEN-ACCEFYN*, Bogota, Colombia.
- Brun, R., Hecker, H. & Lun, Z.R. 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Veterinary Parasitology* 79 (2), 95-107.



- Burneo, S.F., Proaño M.D. y Tirira, D.G. (Eds). 2015. Plan de Acción para la conservación de los murciélagos del Ecuador. Programa para la Conservación de los Murciélagos del Ecuador y Ministerio de Ambiente, Quito Ecuador.
- Calisher, C.H., Holmes, K.V., Dominguez, S.R., Schountz, T. & Cryan, P. 2008. Bats prove to be rich reservoirs for emerging viruses. *Microbe* 3, 521-528.
- Caraballo, V. & Arrivillaga, J. 2010. Registro de *Lutzomyia longipalpis* sensu lato asociada a una cueva, refugio de fauna silvestre (Edo. Falcón, Península de Paraguaná, Venezuela). *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 50 (1).
- Cavazzana, M., Marcili, A., Lima, L., da Silva, F. M., Junqueira, Â. C., Veludo, H. H., ... & Coura, J. R. 2010. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *International journal for parasitology* 40(3), 345-355.
- Chinchilla, M., Troyo, A., Guerrero, O.M., Gutiérrez-Espeleta, G. A., y Sánchez, R. 2005. Presencia de *Trypanosoma minasense* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en *Alouatta palliata* (Primates: Cebidae) de Costa Rica. *Parasitología latinoamericana*, 60(1-2), 90-92.
- Córdoba, L. 2007. Identificación y caracterización molecular de cepas de *Trypanosoma cruzi* y su análisis filogenético mediante secuenciación del gen para citocromo B. Tesis Profesional de Médico Veterinario Departamento de Medicina Preventiva Animal. Universidad de Chile.
- Cottontail, V.M., Wellinghausen, N. & Kalko, E.K.V. 2009. Habitat fragmentation and haemoparasites in the common fruit bats *Artibeus jamaicensis* (Phyllostomidae) in tropical lowland forest in Panamá. *Parasitology* 136 (10), 1133-1145.

- Cottontail, V.M., Kalko, E.K., Cottontail, I., Wellinghausen, N., Tschapka, M., Perkins, S.L. & Pinto, C.M. 2014. High local diversity of *Trypanosoma* in a common bat species, and implications for the biogeography and taxonomy of the *T. cruzi* clade. PLoS One 9. Recuperado de <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0108603>.
- d'Avila-Levy, C. M., Boucinha, C., Kostygov, A., Santos, H. L. C., Morelli, K. A., Grybchuk-Ieremenko, A., ... & Lukeš, J. 2015. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 110 (8), 956-965.
- Delgado, M., Florez, G., García, F. y Machado, M. 2007. Diagnóstico rápido de la comunidad de murciélagos del Parque Negra Hipolita: Fauna sinántrópica de la ciudad de Valencia, Venezuela. FARAUTE Ciencias y Tecnología 2 (2), 26-34.
- Efron, B. 1979. Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. The Annals of Statistics 1-26.
- Ewers, W.H. 1974. *Trypanosoma aunawa* sp. n. from an insectivorous bat, *Miniopterus tristis*, in New Guinea, which may be transmitted by a leech. Journal of Parasitology 60, 172–178.
- Faria, D. 2006. Phyllostomid bats of a fragmented landscape in the north-eastern Atlantic forest, Brazil. Journal of Tropical Ecology 22 (05), 531-542.
- Fenton, M. B., Acharya, L., Audet, D., Hickey, M. B. C., Merriman, C., Obrist, M. K. & Adkins, B. 1992. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. Biotropica 24 (3), 440-446.
- Franzén, O., Talavera-López, C., Ochaya, S., Butler, C. E., Messenger, L. A., Lewis, M. D., ...& Andersson, B. 2012. Comparative genomic analysis of human infective *Trypanosoma cruzi* lineages with the bat-restricted subspecies *T. cruzi marinkellei*. BMC genomics, 13(1), 531.

- Galindo-González, J. 2007. Efectos de la fragmentación del paisaje sobre las poblaciones de mamíferos, el caso de los murciélagos de Los Tuxtlas, Veracruz. En: Sánchez-Rojas, G y A. Rojas-Martínez (Eds). Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos. (pp.97-114). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Gardner, A.L. 1977. Feeding habits. In: Baker, R.J., Jones, J.K. & D.C. Carter (Eds.). Biology of bats of the New World family Phyllostomatidae. Part II (pp.293-350). Special Publications, Museum Texas Tech University.
- Grisard, E. C. 2002. Salivaria or stercoraria? The *Trypanosoma rangeli* dilemma. Kinetoplastid Biology and Diseases 1(5).
- Herrera, C., BARGUES, M.D., Fajardo, A., Montilla, M., Triana, O., Vallejo, G.A. & Guhl, F. 2007. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution* 7, 535-539.
- Hoare, C.A. 1972. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, UK.
- Hodo, C. L., Goodwin, C. C., Mayes, B. C., Mariscal, J. A., Waldrup, K. A., & Hamer, S. A. 2016. Trypanosome species, including *Trypanosoma cruzi*, in sylvatic and peridomestic bats of Texas, USA. *Acta Trópica* 164, 259-266.
- Hughes, A.L. & Piontkivska, H. 2003. Molecular phylogenetics of Trypanosomatidae: contrasting results from 18S rRNA and protein phylogenies. *Kinetoplastid Biology and Disease* 2 (1),1-10.
- Izeta-Alberdi, A., Ibarra-Cerdeña, C. N., Moo-Llanes, D. A., & Ramsey, J. M. 2016. Geographical, landscape and host associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and lineages. *Parasites & Vectors* 9 (1), 631.

- Jackson, A. P. 2015. Genome evolution in trypanosomatid parasites. *Parasitology* 142 (1), 40.
- Jaramillo-Antillón O, Espinoza-Aguirre A. y Lobo-Philp R. 2009. Estado actual de la leishmaniosis en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 51:158–164.
- Kalko, E. K., Handley, C.O. & Handley, D. 1998. Organization and diversity of tropical bat communities through space and time. *Zoology* 101, 281-297.
- Kassahun, A., Sadlova, J., Benda, P., Kostalova, T., Warburg, A., Hailu, A., Baneth, G., Volf, P. & Votypka, J. 2015. Natural infection of bats with *Leishmania* in Ethiopia. *Acta Tropica*. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.024>
- Keasing, F., Holt, R. D. & Ostfeld, R.S. 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecology letters* 9(4), 485-498.
- Lampo, M., Feliciangeli, M.D., Marquez, L.M, Bastidas, C., Lau, P. 2000. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: *Psychodidae*). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62, 718-719.
- Laneti, G. J. 1984. Ecología de los flebótomos (Diptera-psychodidae) y su influencia sobre la leishmaniasis tegumentaria en zonas endémicas del estado Tachira, Venezuela. *Kasmera* 12, (1-4).
- Laval, R. K. y Rodríguez-Herrera, B. 2002. Murciélagos de Costa Rica. Editorial INbio, Santo Domingo, Heredia, Costa Rica. 310p.
- Lemke, T.O. 1984. Foraging ecology of the long-nosed bat *Glossophaga soricina* with respect to resource variability. *Ecology* 65, 538–548.

- Lima, H.D., Rodríguez, N., Barrios, M., Ávila, Á., Cañizales, I. & Gutiérrez, S. 2008. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103, 412-414.
- Lima, V.S., Xavier, S.C., Maldonado, I.F., Roque, A.L., Vicente, A.C. & Jansen, A.M. 2014. Expanding the knowledge of the geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcII and TcV/TcVI genotypes in the Brazilian Amazon. *PloS one* 9. Recuperado de: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0116137>.
- Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Pinto, C.M., Cavazzana, M., Pavan, A.C., Carranza, J.C., Lim, B.K., Campaner, M., Takata, C.S., Camargo, E.P., Hamilton, P.B., Teixeira, M.M. 2015. New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical Pteronotus bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. *Parasitology Vectors* 8, 657.
- Lisboa, C.V., Pinho, A.P., Herrera, H.M., Gerhardt, M., Cupolillo, E. & Jansen, A.M. 2008. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil, *Veterinary Parasitology*. 156, 314–318.
- Loayza, A. P. & Loiselle, B. A. 2008. Preliminary information on the home range and movement patterns of *Sturnira lilium* (Phyllostomidae) in a naturally fragmented landscape in Bolivia. *Biotropica* 40 (5), 630-635.
- Lyon, G.M., Bravo, A.V., Espino, A., Lindsley, M.D., Gutierrez, R.E., Rodriguez, I... & Hajjeh, R.A. 2004. Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica, 1998–1999. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70, 438–42.
- Maia da Silva, F., Marcilli, A., Lima, L., Cavazzana, M. Jr., Ortiz, P.A., Campaner, M... & Teixeira M.M. 2009. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Tropica* 109, 199–207.

- Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Junqueira, A. C. V., Veludo, H. H., Da Silva, F. M., ... & Teixeira, M. M. G. 2009. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* 136(06), 641-655.
- Marinkelle, C. J. 1977. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *longiflagellum* sp. from the tomb bat, *Taphozous nudiventris*, from Iraq. *Journal of Wildlife Diseases*. 13, 262–264.
- Medeiros, A.C.R., Rodríguez, S.S. & Roselino, A.M.F. 2002. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35 (4), 421-424.
- Medellín, R.A. & Gaona, O. 1999. Seed dispersal by bats and birds in forest and disturbed habitats in Chiapas, México. *Biotropica* 31, 432-441.
- Medellín, R.A., Equihua, M., & Amin, M.A. 2000. Bat diversity and abundance as indicators of disturbance in Neotropical rainforests. *Conservation Biology* 14 (6), 1666-1675.
- Mena, J. L. & Medellín, R. A. 2010. Small mammal assemblages in a disturbed tropical landscape at Pozuzo, Peru. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde* 75 (1), 83-91.
- Messenger, L.A., Garcia, L., Vanhove, M., Huaranca, C., Bustamante, M., Torrico, M... & Llewellyn, M. S. 2015. Ecological host fitting of *Trypanosoma cruzi* TcI in Bolivia: mosaic population structure, hybridization and a role for humans in Andean parasite dispersal. *Molecular ecology* 24 (10), 2406-2422.
- Meyer, C. F., Fründ, J., Lizano, W. P., & Kalko, E. K. 2008. Ecological correlates of vulnerability to fragmentation in Neotropical bats. *Journal of Applied Ecology* 45 (1), 381-391.

- Molyneux, D.H., 1991. Trypanosomes of bats. In: Kreier, J.P., Baker (Eds.), Parasitic Protozoa. Academic Press, New York, NY, pp. 95–223.
- Morales-Cortendano, X.A. 2012. Aspectos relevantes de la ecoepidemiología de la Leishmaniasis cutánea no ulcerada en Amalapa, Honduras. Tesis Magister Scientiae en Enfermedades Tropicales. PCVET, Universidad Nacional de Costa Rica.
- Morrison, D.W. 1979. Apparent male defense of tree hollows in the fruit bat *Artibeus jamaicensis*. Journal of Mammalogy 60,11-15
- Mühldorfer, K. 2013. Bats and bacterial pathogens: a review. Zoonoses and Public Health 60 (1), 93-103.
- Panizo, M.M., Dolande, M., Reviakina, V. y Maldonado, B. 2001. Histoplasmosis pulmonar asociada con visita a cuevas: Descripción de un brote epidémico y revisión de la literatura. Revista Sociedad Venezolana de Microbiología 21 (1) 30-35.
- Peraza, J., Urbina, A., & Zeledón, R. 1998. Zymodeme and serodeme characterization of Leishmania isolates obtained from Costa Rican patients. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 93(3), 283-287.
- Pinto, C. M., Kalko, E. K., Cottontail, I., Wellinghausen, N., & Cottontail, V. M. 2012. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rDNA gene for lineage identification. Infection, Genetics and Evolution, 12(6) 1328-1332.
- Pinto, C.M., Ocaña-Mayorga, S., Tapia, E.E., Lobos, S.E., Zurita, A.P., Aguirre-Villacís, F., MacDonald, A., Villacís, A.G., Lima, L., Teixeira, M.M.G., Grijalva, M.J., Perkins, S.L., 2015. Bats, trypanosomes, and triatomines in Ecuador: new insights into the diversity, transmission, and origins of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. PLoS One 10, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0139999>, e013 9999-13.

- Ramírez, J.D., Tapia-Calle, G., Muñoz-Cruz, G., Poveda, C., Rendón, L.M., Hincapié, E., Guhl, F., 2014. Trypanosoma species in neo-tropical bats: biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infection, Genetics and Evolution* 22,250-256.
- Rodríguez G. 2013. Extinción de los murciélagos de Costa Rica. Tesis Magister Scientiae en Conservación y Manejo de Vida Silvestre, ICOMVIS Universidad Nacional de Costa Rica.
- Rodríguez-Herrera, B., Medellín, R.A. y Timm, R.M. 2007. Murciélagos Neotropicales que acampan en Hojas: Neotropical Tent-roosting Bats. Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad. Editorial INbio.
- Sánchez-Azofeifa, G.A., Harris, R.C. & Sokole, D.L. 2001. Deforestation in Costa Rica: A quantitative analysis using remote sensing imagery. *Biotropica* 33, 378-384.
- Sánchez-Rojas, G., y Rojas-Martínez, A. 2007. Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos. Ediciones Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Sánchez, Z., & Russomando, G. 2012. Identificación molecular de linajes y sub-linajes de *Trypanosoma cruzi* en niños infectados congénitamente provenientes de áreas endémicas del Paraguay. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud* 10, 56-61.
- Sato, H., Leo, N., Katakai, Y., Takano, J. I., Akari, H., Nakamura, S. I., & Une, Y. 2008. Prevalence and molecular phylogenetic characterization of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *minasense* in the peripheral blood of small neotropical primates after a quarantine period. *Journal of Parasitology* 94 (5), 1128-1138.
- Savani, E. S., Nunes, V. L., Galati, E. A., Castilho, T. M., Araujo, F. S., Ilha, I.N., ... & Floeter-Winter, L.M. (2005). Occurrence of co-infection by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* and *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *evansi* in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 100 (7), 739-741.



- Savani, E.S., de Almeida, M.F., De Oliveira Camargo, M.C., D'Auria, S.R., Silva, M.M., de Oliveira, M.L. & Sacramento, D. 2010. Detection of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum chagasi* in Brazilian bats. *Veterinary Parasitology* 168, 5-10.
- Schinnerl M., Aydinonat, D., Schwarzenberger, F. & Voigt, C. 2011. Hematological survey of common neotropical bat species from Costa Rica. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 42, 382-391.
- Schneider, M. y Burgoa, C. 1995. Algunas consideraciones sobre la rabia humana transmitida por murciélago. *Revista de Salud Pública de México* 37 (4), 354-362.
- Shapiro, J. T., da Costa Lima Junior, M. S., Dorval, M. E. C., de Oliveira França, A., Cepa Matos, M. D. F. & Bordignon, M. O. 2013. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. *Acta Trópica* 128, 171-174.
- Silva-Iturriza, A., Nassar, J.M., Garcia-Rawlins, A.M., Rosales, R. & Mijares, A. 2013. *Trypanosoma evansi* kDNA minicircle found in the Venezuelan nectar-feeding bat *Leptonycteris curasoae* (Glossophaginae), supports the hypothesis of multiple origins of that parasite in South America. *Parasitology International* 62 (2):95–99.
- Stevens, J., Noyes, H., & Gibson, W. 1998. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93 (5), 669-676.
- Stevens, J. R., Noyes, H. A., Dover, G. A., & Gibson, W. C. 1999a. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology* 118(01), 107-116.
- Stevens, J. R., Teixeira, M. M. G., Bingle, L. E. H., & Gibson, W. C. 1999b. The taxonomic position and evolutionary relationships of *Trypanosoma rangeli*. *International Journal for Parasitology* 29(5), 749-757.

- Tesh, R. B., Chianiotis, B. N. y Johnson, K. M. 1972. Further studies on the natural host preferentes of Panamanian phlebotomine sandflies. *American Journal of Epidemiology* 95, 88-93.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Brenière, S.F., Dardé, M.L. & Ayala, F.J. 1991. Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5129-5133.
- Tibayrenc, M. 1998. Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 93, 577-580.
- Timm, R. M., R. K. Laval y Rodríguez, B. 1999. Clave de Campo para los Murciélagos de Costa Rica. *Brenesia* 52: 1-32.
- Tomasini, N. & Diosque, P. 2015. Evolution of *Trypanosoma cruzi*: clarifying hybridisations, mitochondrial introgressions and phylogenetic relationships between major lineages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 110 (3), 403-413.
- Torrico, M.C., Téllez, T., Tenorio, O., Rojas, L., Huaranca, J.C., De la Barra, A., García, A.L. & Torrico, F. 2013. Tripanosomátidos aislados de mamíferos silvestres en tres departamentos de Bolivia (Cochabamba, Potosí y Santa Cruz de la Sierra). *Gaceta Médica Bolivariana* 36(1), 6-10.
- Viquez-Rodríguez. 2015. Prevalencia de *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma cruzi* en los murciélagos *Carollia Sowellii* y *Sturnira Lilium* bajo dos condiciones distintas de perturbación antropogénica en la Selva Lacandona, Chiapas. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wang, L.F., Shi, Z., Zhang, S., Field, H., Daszak, P. & Eaton, B.T. 2006. Review of bats and SARS. *Emerging Infectious Diseases* 12, 1834-1840.

- Westenberger, S.J., Barnabe, C., Campbell, D.A. & Sturm, N.R. 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*, 171(2), 527-543.
- Zeledón, R. & Vieto, P. L. 1957. Hallazgo de *Schizotrypanum vespertilionis* (Battaglia, 1904) en la sangre de murciélagos de Costa Rica. *Revista Biología. Tropical* 5: 123-128.
- Zeledón, R. & Rosabal, R. 1969. *Trypanosoma leonidasdeanei* sp. nov. in insectivorous bats of Costa Rica. *Annals Tropical Medical and Parasitology* 63, 221–228.
- Zeledón, R., Solano, G., Burstin, L., Swartzwelder J.C. 1975. Epidemiological pattern of Chagas' disease in an endemic area of Costa Rica. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24, 214-225
- Zeledón, R. 1981. *Triatoma dimidiata* y su relación con la enfermedad de Chagas. EUNED, San José, Costa Rica. 164p.
- Zeledón, R., Murillo, J., & Gutiérrez, H. 1985. Flebótomos antropófilos y leishmaniasis cutánea en Costa Rica. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 99, 163-162.
- Zeledón, R., Hidalgo, H., Víquez, A. 1989. Atypical cutaneous leishmaniasis in a semiarid region of north-west Costa Rica. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83, 786.
- Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., ... & Andrade, S. G. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240-253.
- Zuriaga, M. Á., Blandón-Naranjo, M., Valerio-Campos, I., Salas, R., Zeledón, R. & Bargues, M. D. 2012. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* and infection rate of the vector *Triatoma dimidiata* in Costa Rica. *Parasitology Research* 111(4), 1615-1620.