



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CARACTERIZACIÓN DE LA TRANSMISIÓN**

**CAVERNÍCOLA DE *Trypanosoma cruzi***

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:**

**SERGIO ALBINO MIRANDA**

**TUTOR PRINCIPAL: JANINE M. RAMSEY WILLOQUET**

**Centro Regional de Investigación en Salud Pública, CRISP**

**COMITÉ TUTOR: GERARDO SUZÁN AZPIRI**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM**

**JOSÉ ANTONIO GUERRERO ENRIQUEZ**

**.Facultad de Ciencias Biológicas, UAEM**

**CDMX.**

**ABRIL 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ***Agradecimientos***

A mi directora de tesis la Dra. Janine M. Ramsey por brindarme la confianza y su apoyo en la realización de este trabajo, gracias por compartir sus conocimientos y su pasión por la investigación.

A los integrantes de mi comité tutor: Dr. José Antonio Guerrero Enríquez, Dr. Gerardo Suzán Azpiri y Dr. Carlos N. Ibarra Cerdeña, quienes apoyaron desde el primer momento el trabajo y se mantuvieron pendientes del desarrollo del mismo.

A los integrantes de mi jurado: Dr. Juan Pablo Martínez Labat, Dr. Carlos González Rebeles Islas y Dra. Livia Socorro León Paniagua, por sus comentarios para mejorar el manuscrito.

A mis amigos que me ayudaron a realizar el trabajo de campo

Al grupo de trabajo del laboratorio de Chagas: Keynes de la Cruz, Antonio López, Amaia Izeta y Ezequiel Tun-ku por hacer agradable mi estancia en el laboratorio y en la ciudad de Tapachula, gracias por compartir sus experiencias y conocimientos conmigo pero lo más importante gracias por brindarme su amistad.

A mis padres y hermano por brindarme su apoyo y confianza durante todo este tiempo

A mi esposa Edna Vanessa Díaz, quien es la mujer que me inspira a superarme y terminar este reto profesional, gracias por tu apoyo incondicional soportando desvelos o largas ausencias y compartir juntos esta etapa de nuestras vidas.

# Contenido

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT .....	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	6
<b>Objetivos específicos</b> .....	6
MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
<b>Área de estudio</b> .....	6
<b>Caracterización de variables abióticas de la cueva</b> .....	8
<b>Colecta de mamíferos</b> .....	10
<b>Colecta de Triatóminos</b> .....	11
<b>Diagnóstico de <i>Trypanosoma cruzi</i> por PCR</b> .....	12
<b>Identificación de linajes y DTUs de <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	13
<b>Identificación taxonómica de la fuente alimenticia</b> .....	14
ANÁLISIS DE DATOS .....	15
RESULTADOS.....	17
<b>Caracterización de la cueva</b> .....	17
<b>Comunidad de mamíferos</b> .....	17
<b>Colecta de <i>Triatoma</i></b> .....	20
<b>Infección de <i>Trypanosoma cruzi</i> en mamíferos</b> .....	20
<b>Infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> en <i>Triatoma pallidipennis</i></b> .....	22
<b>Variabilidad genética de <i>Trypanosoma cruzi</i></b> .....	26
<b>Análisis genético para poblaciones de TcI</b> .....	27
<b>Análisis genético para poblaciones de TcVI</b> .....	28
<b>Análisis de redes de haplotipos</b> .....	31
<b>Determinación de fuente sanguínea</b> .....	33
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	41
LITERATURA CITADA.....	42

## Índice de Cuadros y Figuras

Figura 1. Ubicación de la cueva “El Salitre” en el estado de Morelos y la división de la cueva en 6 micrositos de estudio.....	7
Figura 2. Distribución de especies de murciélagos en las cámaras de la cueva “El Salitre”. A= Distribución de los murciélagos durante el mes de marzo, B= Distribución de los murciélagos durante los meses entre abril y septiembre.....	9
Figura 3 Muestra las medias de los parámetros físicos; Temperatura (a), Humedad (b) e Intensidad de luz (c), obtenidas con los Datalogers al interior de la cueva durante todo el periodo de muestreo (Marzo-Junio). Utilizando el programa Arc Gis v.10, se generaron los siguientes mapas.....	18
Cuadro 1. Especies de murciélagos recolectadas en la cueva “El Salitre”, según captura por redes de niebla (colectas), o por grabación infrarroja (grabación), en tres meses de 2014. Se incluye el número absoluto (N) y la abundancia relativa (AR) para cada una de las cinco especies encontradas.....	19
Cuadro 2. Infección con <i>T. cruzi</i> diagnosticada por kDNA y mini-exón (ME) en los mamíferos recolectados dentro o inmediatamente fuera (< 100m) de la cueva “El Salitre”. La tasa de eficacia de amplificación con ME, y las secuencias identificadas de TcI y TcII y con infecciones mixtas.....	23
Cuadro 3. Especímenes de <i>Triatoma pallidipennis</i> recolectados dentro, en la boca y al exterior inmediato de la cueva “El Salitre”. Ejemplares recolectados según ubicación y etapa, infección con <i>T. cruzi</i> y fuente sanguínea. M = macho, H = hembra, N5 = ninfa 5, N4 = ninfa 4, N3 = ninfa 3.....	24
Cuadro 4. Infección de <i>T. pallidipennis</i> con <i>T. cruzi</i> recolectados dentro o fuera de la cueva “El Salitre”, según etapa del insecto. La tasa de infección con TcI y TcII e infecciones mixtas están incluidas para las muestras positivas con kDNA que amplificaron para el gen ME.....	25
Cuadro 5. Fuente sanguínea e infección en <i>T. pallidipennis</i> con <i>T. cruzi</i> de recolectados al exterior de la boca de la cueva “El Salitre”, según etapa del insecto. Infección con TcI, TcII e infecciones mixtas están anotados para las muestras que amplificaron con el gen ME.....	26
Cuadro 6. Eficacia de detección de <i>T. cruzi</i> en el contenido intestinal vs el tubo digestivo de <i>T. pallidipennis</i> . G1 es el grupo de chinches que no tuvieron contenido intestinal y solo fue procesado el tubo digestivo, y G2 es el grupo de chinches que tuvieron contenido intestinal y fue procesado por separado el contenido y el tubo digestivo.....	27
Cuadro 7. Muestra la Diversidad genética de <i>T. cruzi</i> de la cueva “El Salitre” y de ocho localidades del estado de Morelos. $\eta$ = número total de mutaciones, S= número de sitios polimórficos, Su= número de sitios únicos, K= número promedio de diferencias nucleotídicas, h= número de haplotipos, Hd= diversidad haplotípica, $\pi$ = índice de diversidad nucleotídica, $\Theta$ = índice de polimorfismo nucleotídico, D y F de Fu y Li = estimadores de neutralidad, y D de Tajima.....	29
Figura 4. Árbol obtenido bajo el criterio de Distancias con el método Neighbor Joining, basado en secuencias parciales del gen mini-exón (257pb) de TcI y TcII. Creado en el programa MEGA v.6.....	30
Figura 5. Red de haplotipos de <i>T. cruzi</i> según taxa colectada dentro o inmediatamente fuera de la boca de la cueva “El Salitre” .....	32

## RESUMEN

En este estudio se analizó la transmisión cavernícola de *Trypanosoma cruzi* en diferentes microambientes de la cueva “El Salitre”, ubicada al centro del estado de Morelos. La infección por *T. cruzi* fue identificada mediante homología de secuencias de kDNA, mientras que los linajes y DTUs fueron analizados usando el gen mini-exón (ME). Se recolectaron un total de 279 mamíferos silvestres pertenecientes a 4 órdenes, 7 familias y 12 especies, resultando 79 (28.3%) organismos positivos a la infección con *T. cruzi*. Las cinco especies de murciélagos recolectadas fueron positivas a *T. cruzi*. En el presente estudio establece el primer registro de *A. hirsutus* y *M. velifer* como reservorios de *T. cruzi*. Las especies de roedores, *B. musculus* y *P. melanophrys* presentaron ejemplares infectados. El único marsupial recolectado (*D. virginiana*) y uno de los dos gatos ferales (*F. catus*) también resultaron positivos a *T. cruzi*. Ninguna muestra de *A. hirsutus* amplificó para ME, el resto de las especies de murciélagos tuvieron infección con TcI, en infección sencilla o mixta. La infección con TcII fue menor, con la excepción de *L. yerbabuena* y *P. parnellii* que no tuvieron infección con ese linaje. *G. soricina* y *M. velifer* fueron las únicas especies con infección mixta. Las dos especies de roedores (*B. musculus* y *P. melanophrys*) presentaron infección sencilla con TcII, mientras que *P. melanophrys* mostró una infección mixta. La única infección en un gato feral (1/2) fue mixta con ambos linajes del parásito, finalmente el tlacuache (*D. virginiana*) tuvo infección sencilla de TcII.

Se recolectaron 74 insectos de los cuales 33 fueron hembras y 24 machos, diez ninfas del 5to, seis del 4to y uno del 3er estadio ninfal. El promedio global de infección fue del 77%, la infección con linaje TcI fue de 60.4%, la tasa de infección de TcII fue de 15.1% y las infecciones mixtas fueron de 9.4%. El análisis de fuente alimenticia indicó que conejos del género *Sylvilagus* son la principal fuente alimenticia de las recolectadas. Los DTUs observados en este trabajo fueron en su mayoría de TcI, y en menor cantidad TcVI, el primero ampliamente distribuido en México circulando en los ciclos domésticos y silvestres. Por otra parte TcVI es considerado como una de los DTU más raros comúnmente asociado a ciclos silvestres.

**Palabras clave: Cueva, Microambiente, Reservorio, Vector**

## ABSTRACT

In this study the transmission of *Trypanosoma cruzi* cave is analyzed in different microenvironments of the cave "El Salitre", located in the center of the state of Morelos. *T. cruzi* infection was identified by sequence homology kDNA while DTUs and lineages were analyzed using the mini-exon gene (ME). A total of 279 wild mammals belonging to 4 orders, 7 families and 12 species were collected, resulting 79 (28.3%) positive organisms to infection with *T. cruzi*. The five species of bats collected were positive for *T. cruzi*. In the present study it establishes the first record of *A. hirsutus* and *M. velifer* as reservoirs of *T. cruzi*. Rodent species, *B. musculus* and *P. melanophrys* had infected specimens. The collected only marsupial (*D. virginiana*) and one of two feral cats (*F. catus*) also prove positive for *T. cruzi*. No sign of *A. hirsutus* amplified for ME, the other species of bats were infected with TcI, in simple or mixed infection. TcII infection was lower, with the exception of *P. parnellii* and *L. yerbabuena* who had no infection that lineage. *G. soricina* and *M. velifer* were the only species with mixed infection. The two species of rodents (*B. musculus* and *P. melanophrys*) had simple infection TcII while *P. melanophrys* showed a mixed infection. The only infection in a feral cat (1/2) was mixed with both lineages of the parasite; finally opossum (*D. virginiana*) had simple infection TcII.

74 insects were collected of which 33 were females and 24 males ten nymphs 5th six and one 4th 3rd nymphal stage. The overall infection rate was 77%. TcI lineage infection was 60.4%, TcII the rate of infection was 15.1% and mixed infections were 9.4%. The blood meal source analysis indicated that the genus *Sylvilagus* rabbits are the main blood meal source of bugs collected. The DTUs observed in this study were mostly TcI, and a lesser amount TcVI, the first widely distributed in Mexico circulating in domestic and wild cycles. However other hand TcVI is considered one of the rarest DTU commonly associated with wild cycles.

**Keywords: Cave, Microenvironment, Reservoir, Vector**

## INTRODUCCIÓN

Los murciélagos son un componente importante de las comunidades neotropicales, debido a que ocupan una gran cantidad de nichos tróficos y suelen ser los mamíferos con mayor riqueza de especies y abundancia en la región (Giannini y Kalko, 2004). Algunas especies de murciélagos se reconocen como importantes reservorios de enfermedades infecciosas y patógenos zoonóticos incluyendo a *Trypanosoma cruzi*, debido a su gran movilidad, amplia distribución y su conducta social (Hamilton *et al.*, 2012a; Ramírez *et al.*, 2013), atributos que pueden amplificar y dispersar la transmisión de patógenos. Los murciélagos, han interactuado con los *T. cruzi* y otros tripanosomas desde hace más de 50 millones de años (m.a.); este tiempo ha permitido una diversificación genética del género, utilizando a los murciélagos como reservorios. Actualmente se sabe que más de 90 especies de murciélagos, han sido reportados con la presencia de una gran variedad de genotipos o DTUs (Unidades Discretas de Tipificación) de *T. cruzi*; TcI, TcII, TcIII TcVI, infección mixta (Noireau *et al.*, 2009; Barnabe *et al.* 2003). Por otro lado, se ha reportado un genotipo de *T. cruzi* único en los murciélagos, denominado Tcbat. En los murciélagos, también se ha reportado la subespecie *T. cruzi marinkellei* y las especies *T. rangeli*, *T. dionisii* y *T. vespertilionis* (Molyneux, 1991; Marcili *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2012). Esta diversificación del género *Trypanosoma* ha dado paso a la hipótesis de que a partir de un antepasado de los tripanosomas, estos aparecieron y se diversificaron dentro de los murciélagos, y solo algunos clados lograron saltar a los mamíferos terrestres e incluso al hombre. Los insectos triatóminos que se alimentan de los murciélagos, mamíferos arborícolas y terrestres pueden haber facilitado la transición a otras especies de mamíferos (Cavazzana *et al.*, 2010; Hamilton *et al.*, 2011 y 2012a; Lima *et al.*, 2012).

Los marsupiales son otro grupo de mamíferos estrechamente relacionados en la transmisión de *T. cruzi*, este grupo suele tener densas parasitemias, Evolutivamente los marsupiales se han adaptado al grado de poder ser reservorios y vectores a la vez y son considerados como uno de los primeros grupos de mamíferos no

voladores que interactuaron con *T. cruzi* hace aproximadamente 38 m. a. (Legey *et al.*, 2003; Yeo *et al.*, 2005).

La importancia de una especie hospedadora como depósito de un patógeno de transmisión vectorial depende principalmente de la prevalencia de la infección en esta, la capacidad del hospedero para infectar insectos, y la tasa de contacto hospedero-vector (Cohen y Gürtler, 2001). Al tratarse de un parásito multi-hospedero, su ciclo de transmisión representa un sistema complejo, donde sus poblaciones son mantenidas en la naturaleza por numerosas especies de vectores y reservorios, por lo que puede estar presente en la mayoría de biomas y hábitats de América, incluyendo los ambientes cavernícolas. (Thomas *et al.*, 2007; Lisboa *et al.*, 2009; Añes *et al.*, 2009; Roque *et al.*, 2013).

La transmisión de *T. cruzi*, incluye mamíferos con distintas capacidades de dispersión, los animales domésticos amplifican las poblaciones presentes de *T. cruzi*, los roedores, xenartros y marsupiales mantienen el flujo de las poblaciones peridomésticas y de ecotono principalmente, por su parte los carnívoros y murciélagos mantienen el flujo de las poblaciones de ecotono a silvestres y ocasionalmente a peridomiciliario. Los murciélagos son los principales dispersores de mayor amplitud debido a su capacidad de volar y desplazarse a grandes distancias, así como la capacidad de ocupar distintos refugios durante el año (Rademaker *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2013).

Los refugios son los sitios donde ocurre la interacción vector-hospedero, suelen ser lugares rocosos, arboles huecos, construcciones abandonadas y cuevas (De la Fuente *et al.*, 2008). El uso de una cueva como refugio depende de la disponibilidad de recursos, así como de las condiciones microclimáticas como la estructura de la cueva, el flujo de aire, la humedad relativa, la temperatura, la intensidad de luz (Ávila y Medellín, 2004; Pekins, 2006; Ladle *et al.*, 2012; Solano, 2003). Una cueva por lo general presenta tres zonas. 1) Zona de penumbra, cercana a la entrada y de condiciones similares a las del exterior. 2) Zona de media, en completa oscuridad

y de temperatura variable, 3) zona profunda de la cueva, de completa oscuridad con temperatura constante (Hoffmann *et al.* 1986; Arita, 1994). En cada zona existen condiciones microambientales que reflejan los requerimientos fisiológicos, reproductivos y sociales de las especies animales que las habitan (Hoffmann *et al.* 1986).

Como microambiente en una área modificada (ecotono), una cueva representa un ecosistema zoonótico único, debido a sus características abióticas, y la dominancia de mamíferos voladores y el registro de la afinidad de los triatóminos a estos sitios. Guhl y colaboradores (2007) afirman que las cuevas son ecotipos silvestres fundamentales para la comprensión epidemiológica de *T. cruzi*. Por ejemplo en cuevas de Guatemala, se ha reportado interacciones entre *Triatoma dimidiata* y 10 mamíferos distintos, entre los que destaca la fuente sanguínea humana, animales domésticos, así como tlacuaches, roedores y murciélagos (Stevens *et al.*, 2014).

Las cuevas Neotropicales utilizadas por los murciélagos, proporcionan un refugio y alimento para otros mamíferos (roedores, carnívoros y marsupiales) que pueden ser visitantes frecuentes o residentes permanentes. Además hay una alta diversidad de invertebrados, que encuentran su hábitat en el guano de los murciélagos (Ladle *et al.*, 2012).

Una gran parte del territorio mexicano está formada por rocas sedimentarias que permiten la formación de cuevas, pero el número, la ubicación y la biodiversidad de las cuevas mexicanas sólo se conoce parcialmente. Se calcula que existen más de siete mil cuevas o cavernas en el país (Lazcano, 1983; Espinoza, 1999). En el estado de Morelos han sido registradas alrededor de 33 cuevas, sin embargo se estima que éstas representan apenas un 10% de las que pueden existir en el Estado. La cueva “El Salitre”, se encuentra ubicada al centro del estado de Morelos, es una de las cuevas más importantes debido a sus dimensiones y a la riqueza de fauna que alberga, incluyendo varias especies de murciélagos y reduvidos hematófagos de la especie *Triatoma pallidipennis*. Es probable que exista la

presencia de distintos roedores, carnívoros y marsupiales, que son abundantes en la región y se sabe que presentan cierta afinidad a refugiarse o alimentarse en cuevas (Hoffmann *et al.* 1986).

En el estado de Morelos se ha registrado principalmente a *Triatoma pallidipennis*, en menor frecuencia *T. dimidiata* y *T. barberi* (Ramsey *et al.*, 2003), siendo la primera el vector más importante de *T. cruzi* para el Estado (Medina-Torres *et al.*, 2010). En la entidad, se ha reportado que este insecto se puede encontrar entre rocas apiladas, paredes de roca o carrizo, graneros, cuevas, techos de teja, paja o carrizo. Además, asociado a lotes sin construir (Bautista *et al.*, 1999; Ramsey *et al.*, 2000; Enger *et al.*, 2004). Se ha reportado, aproximadamente 150 comunidades rurales infestadas con vectores (Cohen *et al.*, 2006). Tan solo en el municipio de Tlatizapán, en donde se realizó un estudio de prevalencia, el 87% de los triatóminos colectados estaban parasitados con *T. cruzi*. Mientras que en la localidad de Chalcatzingo se reportaron triatóminos con una prevalencia del 50% (Villegas-García y Santillán-Alarcón, 2001; Ramsey *et al.*, 2012).

Estudios realizados en el estado de Morelos han reportado varias especies de mamíferos silvestres como reservorios de *T. cruzi*. Por ejemplo, en el municipio de Tlatizapán se han reportaron varias especies de roedores (*Peromyscus melanophrys*, *Baiomys musculus*, *Neotoma mexicana* y *Liomys irroratus*) con una prevalencia de infección del 30%, los mamíferos medianos como *Didelphis marsupialis* con el 87% y los murciélagos *Pteronotus parnelli* y *Artibeus jamaicensis* con una prevalencia del 21% (Villegas-García y Santillán-Alarcón, 2001). En el municipio de Jiutepec, se registró la presencia de *T. cruzi* en ratones de las especies *Rattus rattus*, *Peromyscus melanophrys*, *Liomys irroratus*, *Baiomys musculus* y *Mus musculus* con prevalencias hasta del 50%, mientras que murciélagos de las especies *Artibeus jamaicensis*, *Sturnira parvidens*, *Leptonycteris yarbabuena*, *Pteronotus parnellii* y *Desmodus rotundus* tuvieron prevalencias entre 36 y 59% (Villegas-García y Santillán-Alarcón, 2004). En la localidad de Chalcatzingo, ubicada en la región sureste del estado, en el municipio de Jantetelco, siete

especies de ratones se encontraron infectadas con *T. cruzi*. Las especies más abundantes como; *Sigmodon hispidus*, *Liomys irroratus*, *Mus musculus* y *Peromyscus levipes*, tuvieron una prevalencia promedio del 6.2%, mientras especies menos abundantes como *Baiomys musculus* y *Rattus rattus* tuvieron una prevalencia cerca al 30%. En esa comunidad, los murciélagos colectados no presentaron infección de *T. cruzi* (Ramsey *et al.*, 2012). Finalmente un estudio realizado en ocho localidades del estado de Morelos, se registraron prevalencias del 4% al 20% en roedores de las especies *Rattus rattus*, *Liomys irroratus*, *Peromyscus levipes*, *Peromyscus melanophrys*, *Reithrodontomys fulvescens*, *Neotoma mexicana* y *Baiomys musculus* (Montes, 2014).

No existen estudios sobre la transmisión de *T. cruzi* en ambientes cavernícolas, sin embargo, en estudios realizados en otros tipos ambientes silvestres o de ecotono se ha documentado la participación de los murciélagos en ciclos de transmisión de *T. cruzi* (López-Cancino *et al.*, 2015). Debido a la creciente evidencia de la infección amplia de diferentes grupos de murciélagos con *T. cruzi* en el país, es importante analizar la dinámica del parásito en los microambientes cavernícolas, determinar si los patrones migratorios de los murciélagos presentes en la cueva tienen importancia en el mantenimiento y dispersión de las poblaciones de *T. cruzi*. Analizar si la distribución y abundancia relativa de los mamíferos dentro de la cueva es relevante en la transmisión de *T. cruzi*. Asimismo, es importante medir la prevalencia de *T. cruzi* en las especies de mamíferos y triatóminos presentes en el hábitat cavernícola. O si los factores microclimáticos de la cueva influyen en la interacción entre vector-hospedero.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Caracterizar la asociación entre la abundancia de los reservorios y la prevalencia de infección de *Trypanosoma cruzi* en diferentes microambientes dentro de la cueva.

## **Objetivos específicos**

- Caracterizar el ambiente y la biodiversidad de un hábitat cavernícola con presencia de *T. cruzi*.
- Medir la prevalencia de *T. cruzi* en las especies de mamíferos y triatóminos presentes en el hábitat cavernícola.
- Asociar la prevalencia de infección con la abundancia relativa de los murciélagos.
- Comparar los Unidades Discretas de Tipificación (DTUs) de *T. cruzi* encontrados en los vectores y reservorios de la cueva con los reportados en otras aéreas del estado de Morelos

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

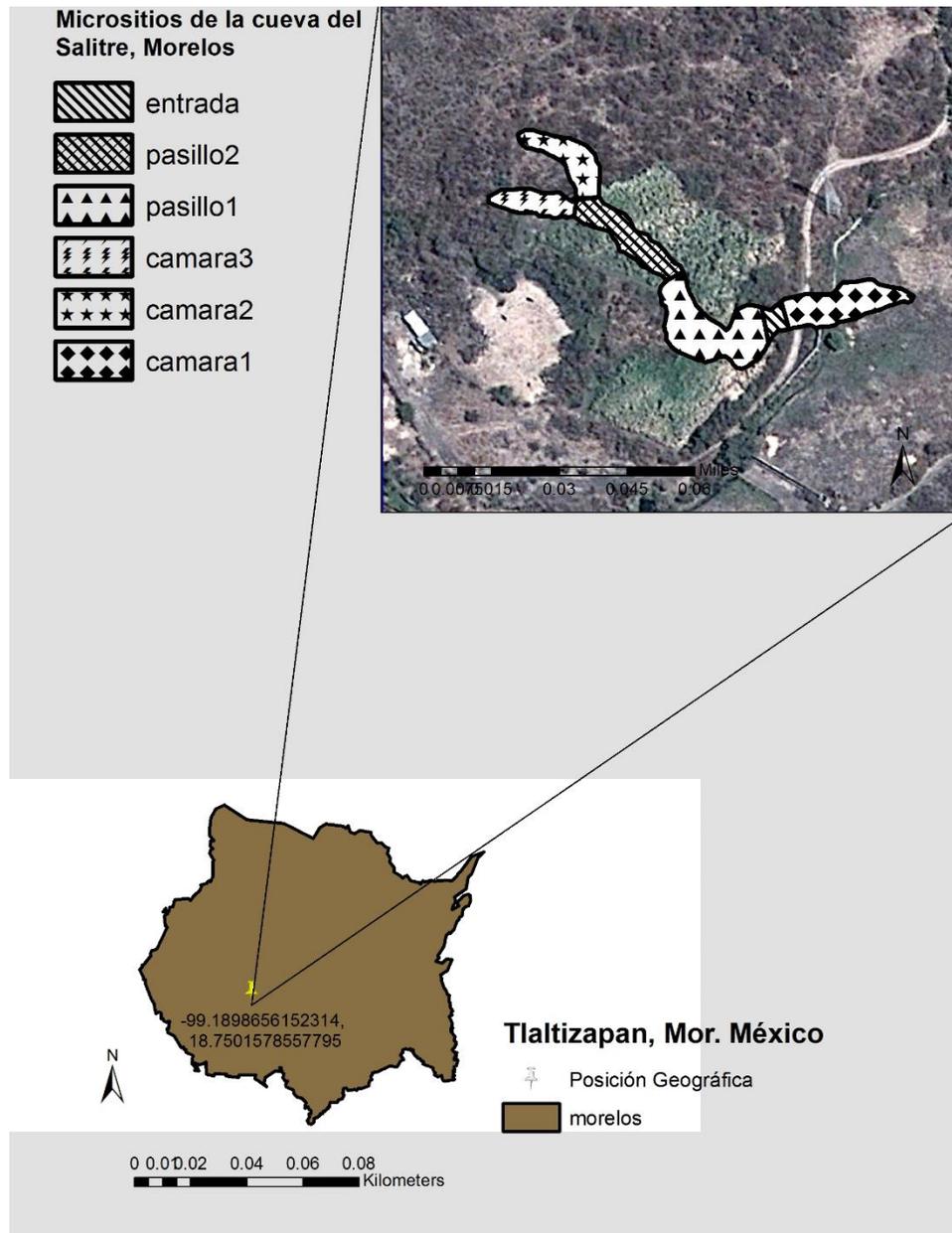
### **Área de estudio**

La cueva “El Salitre” se ubica en el municipio de Tlaltizapán, en la localidad de Tetecalita (UTM 0479987 y 2073194, sistema WGS84) a una altitud de 1,100 msnm. El clima de esta zona es cálido subhúmedo con lluvias en verano (Figura1). De manera general, la vegetación del área está compuesta de pequeños parches de vegetación secundaria arbustiva y la cueva se encuentra rodeada de áreas de cultivo y potreros. Existen varias unidades habitacionales.

Frente a la entrada de la cueva se encuentra un campo de cultivo de caña (*Saccharum officinarum*), con una extensión de aproximadamente 2 ha. Alrededor

del cultivo se encontraron seis especies arbóreas nativas de la selva estacional (*Ipomea arbórea*, *Guazuma ulmifolia*, *Lysiloma divaricatum*, *Acacia sp*, *Pithecellobium dulce*, *Heliocarpus sp*).

Figura 1. Ubicación de la cueva “El Salitre” en el estado de Morelos y la división de la cueva en 6 microsítios de estudio.



A ocho metros al este de la entrada se encuentra una vereda donde transitan personas a pie, caballos y camionetas. Junto al camino se encuentra un canal de riego, seguido por una zona árida. A menos de 100 metros al sureste de la entrada de la cueva, se localiza una casa habitada y un potrero/establo para ganado vacuno y equino.

La cueva se encuentra compuesta por tres cámaras diferenciadas estructuralmente y un pasillo que conecta con cada una de ellas. A lo largo de toda la cueva (225 metros lineales) se pueden observar escorrentías de salitre, lo que le da el nombre al refugio (Hoffmann *et al.* 1986). La cueva se encuentra en una zona geológica de origen volcánico, dentro de la formación Morelos, y está compuesta principalmente de caliza y dolomita de edad Albiano-Cenomaniano (130-100 m. a) (Fries, 1960; Bonet, 1971). Ambas rocas presentes en la cueva son clasificadas como calcáreas, presentando facultad de disolverse y ampliar fisuras iniciales. Esta característica permite la formación de paredes complejas, con cavidades a toda escala que pueden ser utilizadas como refugios de artrópodos (Galán, 1993).

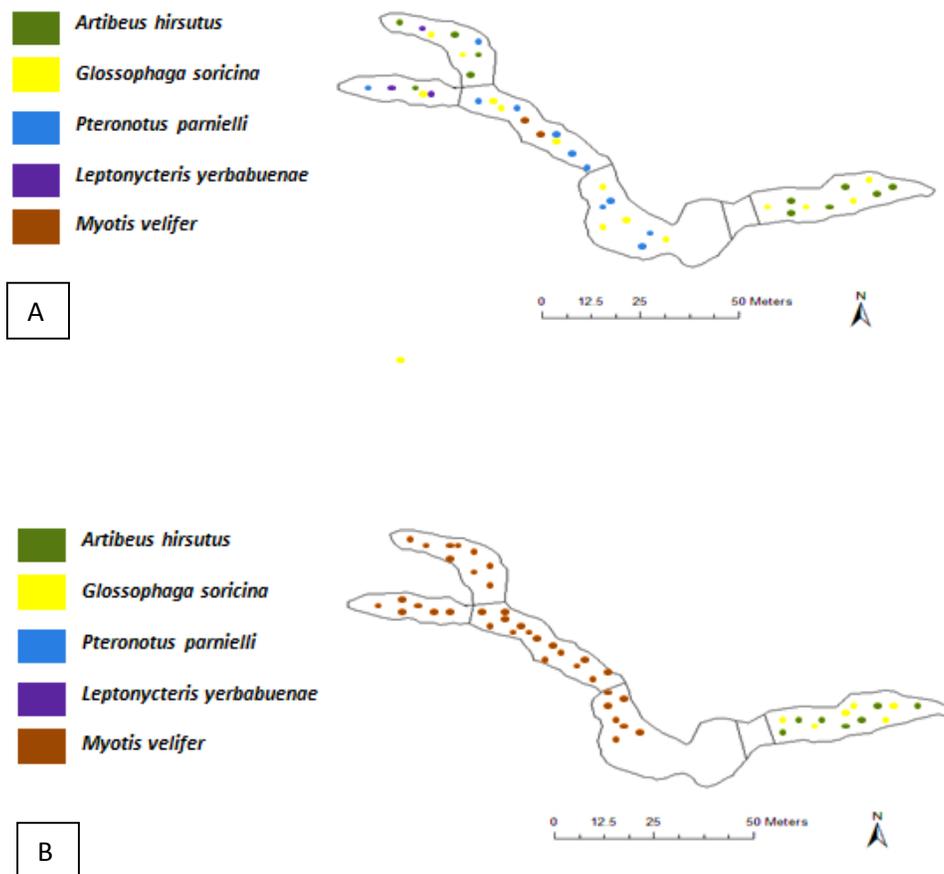
La composición de la comunidad de invertebrados está representada por una gran variedad de artrópodos; ácaros, coleópteros, lepidópteros, himenópteros y hemípteros (Hoffmann *et al.*, 1986). Los murciélagos se distribuyen a lo largo de toda la cueva en pequeños grupos de *Artibeus hirsutus* y *Glossophaga soricina*, estacionalmente colonias de *Pteronotus parnellii*, una pequeña población temporal de *Leptonycteris yerbabuena* y una importante colonia de maternidad de *Myotis velifer* que desplaza a la mayoría de las especies de finales de marzo a principios de septiembre (Hoffmann *et al.* 1986; Peralta-Rodríguez, 2009; Fuentes-Vargas, 2011; Monter, 2013; Figura 2).

### **Caracterización de variables abióticas de la cueva**

Las variación de la temperatura y humedad relativa del interior de la cueva fueron medidas con Data loggers (Omega USB-502). La velocidad y dirección del aire se

cuantificó utilizando anemómetros, y finalmente con un fotómetro se registró la intensidad de luz a lo largo de la cueva. Adicionalmente, se midió el volumen de las cámaras de la cueva. En conjunto, los datos se utilizaron para delimitar diferentes microambientes. Debido a la profundidad de la cueva y la forma física de la misma, se dividió en seis segmentos o microsítios (entrada, cámara 1, cámara 2, cámara 3, pasillo 1, pasillo 2; Figura 1). Se caracterizó la vegetación circundante en un radio de 50 metros a partir de la boca de la cueva. Dentro de esta área se realizaron colectas de triatóminos y mamíferos terrestres, para obtener información sobre la presencia de reservorios potenciales de *T. cruzi* en este perímetro.

Figura 2. Distribución de especies de murciélagos en las cámaras de la cueva “El Salitre”. A =Distribución de los murciélagos durante el mes de marzo, B =Distribución de los murciélagos durante los meses entre abril y septiembre.



## **Colecta de mamíferos**

En el mes de mayo del 2012 se realizó un muestreo piloto en la cueva “El Salitre”, en el cual fueron colectadas 63 hembras preñadas de *Myotis velifer* (Cuadro 1), debido a que en ese mes se encuentra una colonia de maternidad de dicha especie (Fuentes-Vargas, 2011). El muestreo principal se realizó durante marzo y mayo del 2014.

Los murciélagos fueron capturados utilizando una red de niebla de 8m de longitud por 2 de alto, colocada en la salida de la cueva entre las 19 y las 22 horas. Las colectas de murciélagos fueron realizadas durante dos noches seguidas, y el esfuerzo de muestreo final fue de 16m/12hrs/ 192m/r. Para estimar la abundancia relativa de la colonia de murciélagos se realizaron videograbaciones a la salida de la cueva con vídeo de infrarrojos (cámara Nightshot Sony) siguiendo el método de Rodríguez y Palmeirim, (1994). Se realizaron grabaciones de una hora durante cuatro noches seguidas de cada mes (marzo, abril y mayo), iniciando cuando se observaba un flujo considerable de murciélagos emergiendo del refugio. El esfuerzo final de las grabaciones fue de 12hrs. Este método no invasivo permite evitar alteración en el comportamiento natural de las especies, y así comparar los cambios en la abundancia de las diferentes especies en el refugio y complementar las capturas por redes.

Los mamíferos medianos fueron colectados usando trampas Tomahawak, ubicadas dentro de cada bóveda, con cebos de trozos de sardina como atrayente, durante cinco días consecutivos. Al exterior de la cueva, se muestreó un radio de 40 metros a partir de la boca de la cueva, se colocaron cuatro trampas Tomahawak. La captura de roedores se realizó utilizando 32 trampas Sherman separadas cada diez metros por medio de transectos junto a las paredes de la cueva. Debido a la alta humedad registrada dentro de la cueva, las trampas fueron cebadas con granos de maíz compuesto (para evitar crecimiento de hongos). Las trampas fueron revisadas una vez al día, durante 10 días. Al exterior de la cueva se utilizaron 32 trampas Sherman colocadas en transectos alrededor de la entrada de la cueva en un radio de 40

metros, se utilizó el mismo cebo y debido a las altas temperaturas y exposición solar de las trampas, fueron revisadas dos veces al día durante tres días. El esfuerzo de muestreo para los roedores y mamíferos medianos fue de un área total de 1622 m<sup>2</sup>.

Todos los especímenes colectados (permiso No. SGPA/DGVS/11728/14) fueron identificados a nivel de especie, usando las claves de Álvarez-Castañeda (1996) y Medellín *et al.*, (2008). El peso y las medidas morfométricas y reproductivas convencionales (longitud total, longitud de la pata, longitud de la oreja, longitud del antebrazo y peso), sexo y estado reproductivo de cada ejemplar fueron registradas. Los organismos fueron sacrificados con cloroformo y el corazón fue conservado en alcohol al 95%, para análisis moleculares. El cuerpo completo de todos los animales fue preservado en etanol al 95%. Se obtuvo una muestra de sangre, de 57 especímenes de *Artibeus hirsutus* debido a que está listada como especie vulnerable en la clasificación de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), después de ser procesados los especímenes fueron liberados en el sitio de captura.

### **Colecta de Triatóminos**

Para la recolección de chinches dentro y fuera de la cueva se implementaron cuatro diferentes estrategias: 1) A lo largo de toda la cueva se colocaron mantas de tela blanca en el suelo cubriendo un espacio de tres metros desde la pared, donde se realizó un cepillado en las paredes hasta su altura máxima; 2) Se realizó una búsqueda exhaustiva de chinches removiendo piedras del suelo y localizando madrigueras de mamíferos como roedores y tlacuaches; 3) Se utilizaron trampas para insectos de luz negra, las cuales fueron colocadas junto a zonas rocosas y cerca de las grietas notorias dentro de la cueva, y al exterior junto a árboles con troncos huecos. Las trampas fueron activadas a las ocho de la noche y revisadas periódicamente cada 15 minutos, manteniéndose activas durante dos horas. 4) Se utilizaron cinco gallinas como cebo vivo, las cuales fueron colocadas

individualmente dentro trampas Tomahawak (1.7cm x 36cm) cubiertas por cinta adhesiva de doble cara, agrupadas dentro de cada cámara de la cueva y revisadas dos veces al día. Las gallinas fueron colocadas una noche por micrositio; diariamente se les alimentaba y se revisaba detenidamente un perímetro de 3 metros alrededor de ellas y finalmente se revisaba el estado de la cinta y su capacidad adherente.

De todos los triatóminos colectados se registró la especie, estadio ninfal y el sexo de adultos y posteriormente los insectos fueron colocados en frascos con alcohol al 90% separándolas por cada micrositio de la cueva. La identificación taxonómica se realizó utilizando la clave de Lent y Wygodzinsky (1979). Con la finalidad de realizar el diagnóstico molecular de *T. cruzi* a los insectos se les extrajo el tubo digestivo y el contenido estomacal por separado en caso de presentarlo, los cuales se colocaron en tubos eppendorff con 300µL de DNAzol.

### **Diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* por PCR**

La presencia de *T. cruzi* fue confirmada mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) de tejido cardíaco de los hospederos; y del tubo digestivo y contenido intestinal de los triatóminos siguiendo procedimientos estandarizados (Ramsey *et al.*, 2012). El ADN genómico (ADNg) fue extraído utilizando aproximadamente 25 mg de tejido y DNAzol (Invitrogen), siguiendo el protocolo para extracción de ADN total descrito en el manual de procedimiento del producto. El pellet de ADNg extraído fue resuspendido en 80µl de agua libre de nucleasas, y conservada a 20°C hasta su uso para el diagnóstico molecular de *T. cruzi*, para caracterizar el linaje de *T. cruzi* y para la identificación de fuente alimenticia.

La infección de *T. cruzi* en tejidos de mamíferos e intestinos de chinches fue identificada mediante la amplificación de regiones conservadas de ADN del minicírculo del kinetoplasto, usando los oligonucleótidos S34 59- ACA CCA ACC CCA ATC GAA CC-39 y S67 59-TGG TTT TGG GAG GGG SSK TC-39 que

amplifican un fragmento de 120pb (Sturm *et al.*, 1989; Ramsey *et al.*, 2012). La reacción final de PCR fue de 25µl, conteniendo 5µL de Bufer, 2µl de NaCl, 1.5µldNTPS, 13.85µl rna free water y 0.15µl Taq polimerasa. Los ciclos de PCR consistieron de una primera desnaturalización por cuatro minutos a 94°C, seguida por 35 ciclos que constan cada uno de 30 segundos para la desnaturalización del ADN a 94°C, 30 segundos para el templado o pegado de los *primers* a 60°C y 30 segundos para la extensión a 72°C, y una última extensión por 10 minutos a 72°C (Mota *et al.*, 2007).

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de 2% agarosa, teñidos con bromuro de etídio y observados bajo luz UV en un transiluminador. En todas las reacciones de PCR se utilizó como control positivo una muestra de ADNg de *T. cruzi*, cepa Cari06 (Breniere *et al.*, 2003). Se realizó una segunda PCR para la mayoría de las muestras con los mismos oligonucleótidos y condiciones, debido a la baja tasa parasitaria en los tejidos, y la competición por amplicones no-específicos de origen del reservorio (López-Cansino *et al.*, 2015).

Todos los productos de PCR fueron purificados con Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Debido a amplicones no específicos de un tamaño similar a la banda esperada de *T. cruzi* (aproximadamente 120pb), todas las bandas entre 110 y 130 pb fueron purificadas y secuenciadas para verificar su identidad, comparándolas con secuencias depositadas en la base de datos de GenBank.

### **Identificación de linajes y DTUs de *Trypanosoma cruzi***

Las muestras de tejidos o contenidos intestinales positivos para *T. cruzi* con los oligonucleótidos S34/S67 fueron analizados para linaje y DTUs mediante amplificación de la región intergénica del gen de mini-exón utilizando tres oligonucleótidos (Fernandes *et al.*, 1998). Dos oligonucleotidos río arriba (upstream), derivados de la región hipervariable del gene mini-exón fueron: (TC-5'-

GTG TCC GCC ACC TCC TTC GGG CC-3' y TC2-5'-CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G-3') y un oligonucleótido río abajo (downstream), que corresponde a las secuencias presentes en ambos linajes principales de *T. cruzi*, TcI y TcII, fue: (TC-5'-CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG-3'). Se utilizó la reacción de PCR modificada por Botero *et al.*, (2007), usando un volumen de 2µl ADN molde de las muestras de mamíferos y triatóminos positivas a *T. cruzi* (S34/S67) en un volumen final de 25µl. Las condiciones de amplificación consistieron en una temperatura inicial de desnaturalización a 94°C por 3 min, seguido de 27 ciclos de desnaturalización del ADN a 94°C por 30 seg, alineamiento de los oligonucleótidos a 55°C por 30 seg, y elongación de la cadena a 72°C por 30 seg, y un período de elongación final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR de 350 pb están esperados para linaje I, y 300 pb para linaje II. Los amplicones fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y observados en luz UV. Para optimizar la amplificación del gen del mini-exón de las muestras positivas se realizó una segunda PCR, usando las mismas condiciones, utilizando las bandas de los tamaños esperados, evidentes o no en UV. Todos los productos de PCR fueron purificados y secuenciados para verificar su identidad.

### **Identificación taxonómica de la fuente alimenticia**

Las fuentes de alimentación de los triatóminos fueron identificadas por PCR siguiendo la metodología desarrollada por Mota *et al.*, (2007). Se emplearon tres oligonucleótidos a un volumen final de 25 µl, usando 1µl de ADN molde, los oligonucleótidos se utilizaron a una concentración de 50, 15 y 36 pM, respectivamente. Los ciclos de PCR consistieron en: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 51°C por 30 segundos, y una temperatura de extensión a 72°C por 30 segundos, y un periodo de extensión final a 72°C durante 10 minutos, los productos fueron separados en geles de agarosa al 2% y visualizados con luz UV.

## ANÁLISIS DE DATOS

Se construyó una curva de acumulación de especies de mamíferos que fue usada para determinar la eficiencia del muestreo y estimar la cantidad de especies presentes en la zona (Jiménez-Valverde y Hortal, 2003) empleando el programa EstimateS v. 8.2 (Colwell 2012). La abundancia absoluta de las especies de los murciélagos fue calculada a partir de las videograbaciones a la salida de la cueva. Una vez identificadas las especies grabadas, fue contado el número de individuos por especie que entraban y salían del refugio. El total de entradas observadas fue restado del total de salidas, evitando con ellos sobrestimar el número de ejemplares, utilizando la fórmula:  $N=le-li$  donde,  $N$ = tamaño poblacional de la especie  $r$ ,  $le$ = número de individuos que emergen del refugio, y  $li$ = número de individuos que ingresan al refugio.

Se realizaron análisis de frecuencias entre la prevalencia de *T. cruzi* asociada con la especie y el sexo de los reservorios, edad y sexo del vector, por grupo trófico de los murciélagos (frugívoros, insectívoros y nectarívoros), según la permanencia de especies en la cueva (permanentes= *G. soricina* y *A. hirsutus* y temporales= *P. parnellii*, *L. yerbabuena* y *M. velifer*), según mamíferos voladores vs no voladores, según fecha de colecta (2012 vs 2014). Las asociaciones anteriores fueron evaluadas usando una prueba de Mann Whitney o de Kurskal-Wallis según el caso, para determinar si existe diferencia significativa en dichas asociaciones. Finalmente se utilizó una regresión lineal simple para entender la relación entre la prevalencia de infección y la abundancia relativa de las especies de murciélagos. Lo anterior se realizó en el programa Statistica v. 10 (StatSoft. 2011).

Las secuencias obtenidas fueron alineadas en el programa BioEdit v.7.0.9. (Hall, 2004). Se utilizaron secuencias de referencia de cinco TcI (TclaAM259467, Tclb AM259469, Tclc AM259472, Tclid AM259473, TcleEF576840), y cinco secuencias del resto de DTUs (números de acceso de GenBank: AY367125, Tu18; AY367126, M5631; AY367123, CanIII; AY367128, MN y AF510513, CLBrenner). Se construyó un árbol de distancias genéticas de Nei, que consiste en incorporar distancias

corregidas como la de Tamura-Nei o Jukes y Cantor y así poder determinar la composición nucleotídica del gen, para comparar las secuencias de nucleótidos, este análisis se realizó en el programa Mega v.4. Se utilizó el programa DNAsp v5 (Rozas, 2009) para el análisis de haplotipos y la relación filogenética fue reconstruida con el método de median-joining (MJ). Se determinaron los índices de variabilidad genética para un fragmento del gene de mini-exón para las muestras de Tcla y TcVI. El análisis se dividió en a) Cueva “El Salitre” en el estado de Morelos y b) se consideró varias muestras de ocho localidades del estado de Morelos. Se estimaron el número total de mutaciones ( $\eta$ ), número de sitios polimórficos (S), número de sitios únicos (Su), número promedio de diferencias nucleotídicas (K), número de haplotipos (Nh), diversidad haplotípica (Hd), índice de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), e índice de polimorfismo nucleotídico ( $\Theta$ ). Se estimaron las pruebas de neutralidad, D y F de Fu y Li (1993); y D de Tajima (1989), con base en el número de sitios segregantes, usando el programa DnaSP v.5 (Rozas, 2009). Se realizó la prueba de distribución de Mismatch con el programa Arlequín v.3.5 (Excoffier y Litcher 2010), basado en la distancia genética pareada (Roger y Harpending, 1992), con soporte de 10,000 pseudo-réplicas. El índice de Raggedness ( $r$ ) y la suma de las desviaciones al cuadrado (SSD) se utilizaron con el fin de validar el modelo de expansión reciente. La estructura genética poblacional de *T. cruzi* se calculó mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) con 10,000 permutaciones con el programa Arlequín v.3.5 (Excoffier y Litcher 2010). La diversidad genética de *T. cruzi* calculada para la cueva fue comparada con la del hábitat doméstico de las ocho localidades del estado de Morelos, además se comparó Tcl de la cueva con Tcl silvestre y ecotono de las mismas ocho localidades del estado de Morelos, se calculó mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) con 10,000 permutaciones con el programa Arlequín v.3.5 (Excoffier y Lischer, 2010).

Las secuencias de citocromo b obtenidas para la identificación de fuente sanguínea, fueron analizadas por medio de un blast realizado en la base de datos de NCBI,

donde se compararon las secuencias obtenidas con todas las secuencias de la mencionada base de datos. Tomando en consideración aquellas secuencias que presentaran más del 95% de compatibilidad/similitud, y usando la base de CONABIO para especies registradas para el estado.

## **RESULTADOS**

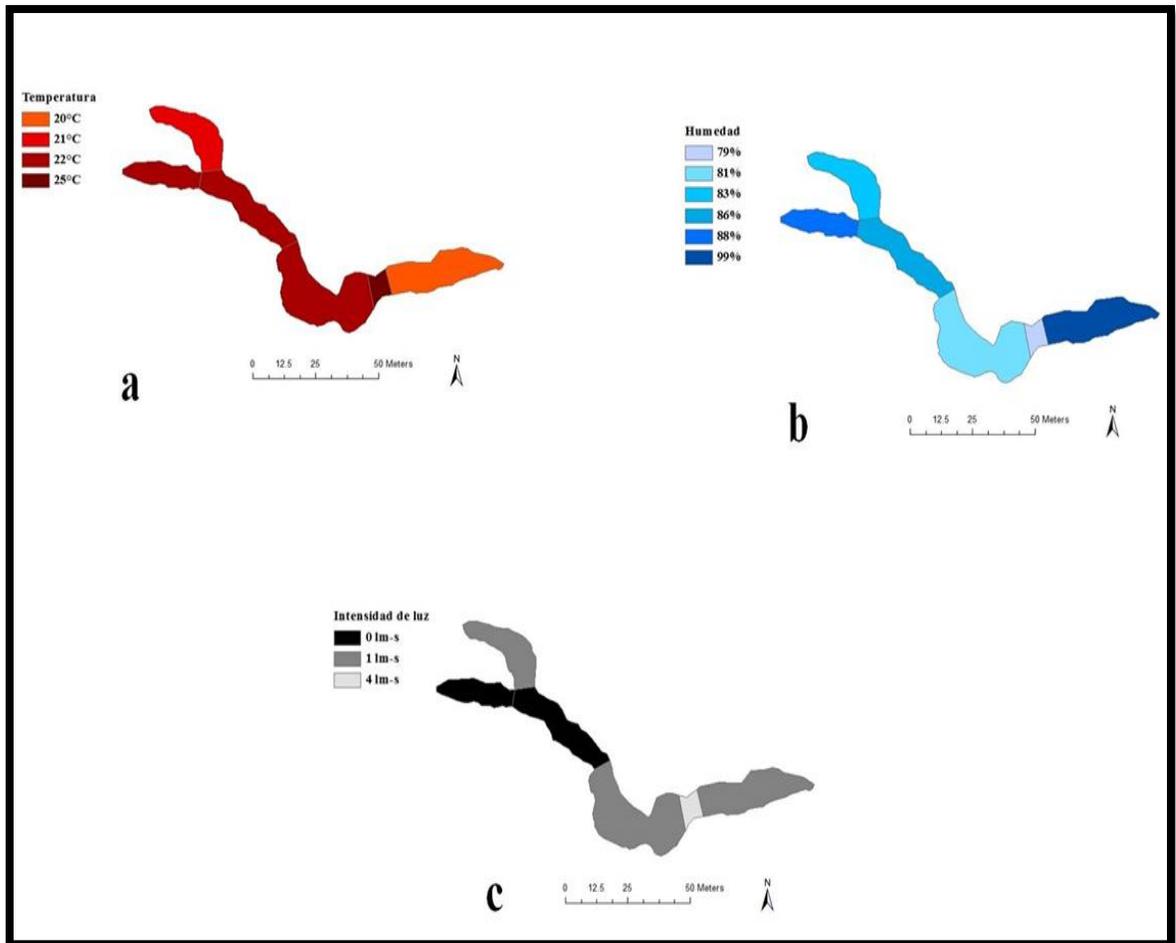
### **Caracterización de la cueva**

La cueva cuenta con una profundidad de 225 metros, la entrada cuenta con 1.8 metros de alto por 4 metros de ancho, la altura de la cueva varía entre 2-6 metros, y el ancho entre 4-12 metros. Los parámetros físicos de temperatura y humedad relativa, fueron poco variables durante todo el periodo de muestreo (marzo-junio). El rango de temperatura fue de 20-25°C, la humedad relativa de 79-99% y finalmente la intensidad de luz de 0-4lm-s (Figura 3).

### **Comunidad de mamíferos**

Las especies recolectadas dentro y fuera de la cueva “El Salitre” alcanzaron una representatividad del 95%, con 12 especies. El rango esperado fue de 8 a 16 especies. Se recolectaron 279 individuos de mamíferos silvestres pertenecientes a 4 órdenes, 7 familias, y 12 especies. El orden más abundante fue Chiroptera, seguido de Rodentia, Carnivora y Marsupialia.

Figura 3. Muestra las medias de los parámetros físicos; Temperatura (a), Humedad (b) e Intensidad de luz (c), obtenidas con los Datalogers al interior de la cueva durante todo el periodo de muestreo (Marzo-Junio). Utilizando el programa Arc Gis v.10, se generaron los siguientes mapas.



Se colectaron 242 individuos pertenecientes a cinco especies de murciélagos de las familias Vespertilionidae, Mormoopidae y Phyllostomidae. En el muestreo piloto de la cueva en mayo de 2012, 63 individuos de *Myotis velifer* fueron colectados. En marzo de 2014, 148 ejemplares fueron colectados, siendo la especie *Artibeus hirsutus*, la más abundante, seguida por *Glossophaga soricina*, *Pteronotus parnellii*, *Leptonycteris yerbabuena* y un pequeño grupo de *Myotis velifer* (Cuadro 1).

Durante el mes de abril las videograbaciones indicaron una variación en las poblaciones, siendo *M. velifer* la especie más abundante seguida de *A. hirsutus*, *G. soricina*, *P. parnellii* y *L. yerbabuena*. En el mes de mayo se colectaron 31 ejemplares de la especie más abundante *M. velifer*, solo se logró registrar un pequeño grupo de *A. hirsutus*, el resto de las especies no fueron observadas durante las grabaciones (Cuadro 1). Al realizar la comparación de las abundancias relativas obtenidas con las grabaciones y las abundancias relativas con lo recolectado en red, se observaron diferencias en *M. velifer* lo grabado fue una tercera parte de lo recolectado, mientras que en *G. soricina* se recolectó la mitad de lo grabado, en *A. hirsutus* se grabó ligeramente más de lo que se recolectó, en *L. yerbabuena* y *P. parnellii* coinciden ambas abundancias relativas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Especies de murciélagos recolectadas en la cueva “El Salitre”, según captura por redes de niebla (colectas), o por grabación infrarroja (grabación), en tres meses de 2014. Se incluye el número absoluto (N) y la abundancia relativa (AR) para cada una de las cinco especies encontradas.

Especies	N (AR) marzo		N (AR) abril	N (AR) mayo
	Colectas	Grabación	Grabación	Grabación
<i>Myotis velifer</i>	18 (12.2%)	23 (3.9%)	1124 (79.4%)	5490 (98.5%)
<i>Artibeus hirsutus</i>	57 (38.5%)	237 (40.6%)	147 (10.4%)	86 (1.5%)
<i>Glossophaga soricina</i>	23 (15.5%)	163 (27.9%)	78 (5.5%)	-
<i>Leptonycteris yerbabuena</i>	19 (12.8%)	62 (10.6%)	25 (1.8%)	-
<i>Pteronotus parnellii</i>	31 (21.0%)	99 (17.0%)	41 (2.9%)	-

Se recolectaron 37 ejemplares de mamíferos no voladores, de los cuales 34 corresponden a cinco especies del orden Rodentia, pertenecientes a dos familias; Cricetidae y Heteromidae, La especie más abundante fue *Baiomys musculus* (21), seguida de *Peromyscus melanophrys* (8), *Liomys irruratus* (3), *Neotoma mexicana* (1) y *Sigmodon sp* (1). Del orden Carnivora dos ejemplares de *Felis catus* y del orden Marsupialia un ejemplar de la especie *Didelphis virginiana* fueron recolectados.

### **Colecta de *Triatoma***

Se recolectaron 74 triatóminos de la especie *Triatoma pallidipennis*, 70 fueron capturados en el micrositio señalado como entrada y en la periferia de la misma, tres fueron donados por la vivienda ubicada a 100 metros de la entrada de la cueva, y otra fue recolectada en el micrositio nombrado como pasillo 2 (Cuadro 4). De los 74 insectos recolectados 57 fueron adultos, de los cuales 33 fueron hembras y 24 machos. Los 17 insectos restantes se encontraron en tres distintos estadios ninfales; diez insectos del 5to estadio, seis del 4to estadio y uno del 3er estadio ninfal. De los 74 insectos, 29 no tuvieron contenido intestinal y se les asignaron al grupo G1, mientras 45 insectos que tuvieron contenido intestinal fueron asignados al grupo G2.

### **Infección de *Trypanosoma cruzi* en mamíferos**

Un total de 79 (28.3%) de 279 ejemplares de mamíferos fueron positivos a *T. cruzi*. La prevalencia de infección del orden Chiroptera fue similar al de Rodentia, 26.4% y 38.2%, respectivamente (Cuadro 2). El único marsupial recolectado y uno de los dos gatos ferales también resultaron infectados.

Las cinco especies de murciélagos recolectadas, fueron infectadas con *T. cruzi*, con tasas de infección de 15.8% (*A. hirsutus*) y 50.0% (*M. velifer*). La tasa global de las poblaciones de *M. velifer* fue de 32.1%, aunque la de mayo de 2012 fue de 27.0% y la de marzo del 2014 de 50.0%. *Glossophaga soricina* fue la especie que tuvo la segunda infección más alta con 30.4%. De todas las infecciones verificadas por homología de las secuencias del kDNA, solo 35.9% de ellas amplificaron con el gen nuclear del mini-exón (ME). Sin embargo, la eficacia de amplificación con ME fue variable, ninguna muestra extraída de la sangre de *A. hirsutus* amplificó con ME, mientras que entre 20.0% y 60.0% de las demás especies y poblaciones amplificaron para este gen.

Con excepción de la población de *M. velifer* colectada en mayo de 2014, todas las demás poblaciones y especies tuvieron infección entre 75% y 100% con TcI, en infección sencilla o mixta. La infección con TcII fue menor a la anterior con un promedio de 47.8%, entre 25.0% y 100.0%, con la excepción de *L. yerbabuena* y *P. parnellii* que no tuvieron infección con ese linaje. *Glossophaga soricina* y *M. velifer* fueron las únicas especies con infecciones mixtas de los dos linajes, entre 16.7% y 25.0%. La infección mixta y la proporcional de los dos linajes no fueron similares entre las tres poblaciones de *M. velifer*. Los dos grupos de muestras recolectadas cuando *M. velifer* es prácticamente la única especie en la cueva, en mayo 2012 y 2014, tuvieron infección mixta baja de 16.7% o nula, respectivamente, en comparación al 25% obtenido para marzo de 2014. Sin embargo, no hubo asociación entre infección mixta e índice TcI/TcII, que fue la más alta en el grupo de mayo, 2012, y la más baja en mayo, 2014.

La prueba de Mann Whitney mostró que la infección con *T. cruzi* es significativamente diferentes entre hembras y machos ( $P= 0.0008$ ) siendo estos últimos los que presentaron un mayor número de infectados. De igual manera la prueba de Kruskal Wallis indicó una diferencia significativa entre la prevalencia de infección y el gremio trófico de los murciélagos ( $P= 0.001$ ) siendo los insectívoros el gremio con mayor infección.

Al comparar las prevalencias de los mamíferos voladores frente a los mamíferos no voladores se encontró una diferencia significativa ( $P=0.0021$ ), donde las prevalencias de los mamíferos voladores obtuvo una tasa de 26.4%, mientras que los mamíferos no voladores a pesar de que sus colectas fueron bajas, se obtuvo una tasa de prevalencia de 38.2%. Al comparar las prevalencias de los murciélagos que son habitantes permanentes con los murciélagos que son habitantes temporales se encontró una diferencia significativa de ( $P=0.0022$ ), siendo los habitantes temporales los que presentaron mayor tasa de prevalencia del 32.8%.

Dos de las cinco especies de roedores, *B. musculus* y *P. melanophrys* tuvieron infecciones de 33.3% y 75.0%, respectivamente. La falta de infección en las demás especies está sin duda relacionada con el número bajo de ejemplares colectados. La eficacia de amplificación del ME fue consistente con la prevalencia de infección en las dos especies de roedores, amplificando en solo 14.3% de *B. musculus*, mientras en 50.0% de *P. melanophrys*. *B. musculus* presentó infección sencilla con TcII, mientras que *P. melanophrys* tuvo infección con TcI y TcII. La única infección en un gato feral (1/2) fue mixta con ambos linajes del parásito. El tlacuache tuvo infección sencilla de TcII

### **Infección por *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma pallidipennis***

Un total de 74 *T. pallidipennis* fueron recolectados dentro, en la boca o inmediatamente al exterior de la boca de la cueva “El Salitre” (Cuadro 3). Un 77% de ellos fueron adultos, las ninfas fueron colectadas solamente al exterior de la cueva. Un macho fue colectado en el pasillo 2 dentro de la cueva, mientras 16 chinches fueron colectadas del techo, pared y suelo de la boca de la cueva. Las chinches del pasillo y de la boca de la cueva resultaron proporcionalmente menos infectadas con *T. cruzi* que las del exterior. El promedio global de infección fue del 77%. Las chinches contenían seis especies de fuente sanguínea, principalmente *Sylvilagus sp*, y una de cada especie de *Sigmodon sp*, *P. melanophrys*, *B. musculus*, *F. catus* y *Capra hircus*.

Cuadro 2. Infección con *T. cruzi* diagnosticada por kDNA y mini-exón (ME) en los mamíferos recolectados dentro o inmediatamente fuera (< 100m) de la cueva “El Salitre”. La tasa de eficacia de amplificación con ME, y las secuencias identificadas de TcI y TcII y con infecciones mixtas

Especie	Núm. positivo <i>T. cruzi</i> (N)	Prevalencia <i>T. cruzi</i>	Tasa Amp ME/kDNA	Mini-exón					
				TcI (# sec)	Tasa TcI	TcII (# sec)	Tasa TcII	Mixto	Infección mixta (%)
<i>Artibeus hirsutus</i>	9 (57)	15.8%	0.0%	0	-	0	-	0	-
<i>Glossophaga soricina</i>	7 (23)	30.4%	57.1%	3 (1)	75.0%	2 (1)	50.0%	1	25.0%
<i>Leptonycteris yerbabuenae</i>	5 (19)	26.3%	20.0%	1 (1)	100.0%	0	-	0	0.0%
<i>Myotis velifer</i> (mayo 2012)	17 (63)	27.0%	35.3%	5 (1)	83.3%	2 (1)	33.3%	1	16.7%
<i>Myotis velifer</i> (marzo 2014)	9 (18)	44.4%	44.4%	4 (3)	100.0%	1 (1)	25.0%	1	25.0%
<i>Myotis velifer</i> (mayo 2014)	10 (31)	32.3%	60.0%	0	0.0%	6 (1)	100.0%	0	0.0%
<i>Pteronotus parnellii</i>	7 (31)	22.6%	28.6%	2 (2)	100.0%	0	-	0	0.0%
<i>Baiomys musculus</i>	7 (21)	33.3%	14.3%	0	0.0%	1 (1)	100.0%	0	0.0%
<i>Liomys irroratus</i>	0 (3)	0.0%	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neotoma mexicana</i>	0 (1)	0.0%	-	-	-	-	-	-	-
<i>Peromyscus melanophrys</i>	6 (8)	75.0%	50.0%	1 (1)	33.3%	2 (2)	50.0%	0	0.0%
<i>Sigmodon spp</i>	0 (1)	0.0%	-	-	-	-	-	-	-
<i>Didelphis virginiana</i>	1 (1)	100.0%	100.0%	0	0.0%	1	100.0%	0	0.0%
<i>Felis catus</i>	1 (2)	50.0%	100.0%	1(1)	100.0%	1 (0)	100.0%	1	100.0%
Total Chiroptera	64 (242)	26.4%	35.9%	53.3%	65.2%	36.4%	47.8%		13.0%
Total Rodentia	13 (34)	38.2%	30.8%	100.0%	25.0%	100.0%	75.0%		0.0%

Cuadro 3. Especímenes de *Triatoma pallidipennis* recolectados dentro, en la boca y al exterior inmediato de la cueva “El Salitre”. Ejemplares recolectados según ubicación y etapa, infección con *T. cruzi* y fuente sanguínea. M = macho, H = hembra, N5 = ninfa 5, N4 = ninfa 4, N3 = ninfa 3.

Habitat	Sitio colecta	N	Etapa					Infección <i>T. cruzi</i>	Fuente sanguínea					
			Hembra	Macho	N5	N4	N3		Syl	Fc	Ch	Pm	Bm	Sig
Entrada cueva	Techo	5	3	2	0	0	0	60.0%	1H	1M	0	0	0	0
	Pared	6	2	4	0	0	0	66.7%	0	0	0	0	0	0
	Suelo	5	4	1	0	0	0	80.0%	1H	0	0	0	0	0
Pasillo 2	Pared	1	0	1	0	0	0	100.0%	0	0	0	0	0	0
Exterior boca de la cueva	Suelo	54	23	14	10	6	1	70.4%	26*	0	0	1N5	1M	1N4
Vivienda 100m	Pared	3	1	2	0	0	0	100.0%	1H	0	1M	0	0	0
Total		74	33	24	10	6	1	71.6%						

\* 14H, 6M, 5N5,  
1N4

La infección con *T. cruzi* fue similar en todas las etapas del ciclo de chinche, aún mayor en ninfas que los adultos (Cuadro 4). Las hembras resultaron significativamente más infectadas que los machos ( $P = 0.01$ ). La infección con linaje TcI fue similar entre adultos y ninfas, representando un 60.4% de las infecciones. Sin embargo, la tasa de infección con TcII fue más alta en las ninfas más jóvenes, a pesar del sesgo por bajo número de colecta, con una tasa global de 15.1%. Asimismo, las infecciones mixtas fueron más altas en las ninfas más jóvenes, sugiriendo varias fuentes alimenticias, y particularmente un cambio de fuente que favorece reservorios infectados con TcI por la quinta ninfa y adultos. Un total de 9.4% de chinches tuvieron infecciones mixtas de linajes. En un análisis minucioso de las colectas de la zona exterior a la cueva, la infección con los diferentes linajes fue similar independientemente de la fuente sanguínea, lo que puede ser entendido por el movimiento constante de los hospederos (Cuadro 5).

Cuadro 4. Infección de *T. pallidipennis* con *T. cruzi* recolectados dentro o fuera de la cueva “El Salitre”, según etapa del insecto. La tasa de infección con TcI y TcII e infecciones mixtas están incluidas para las muestras positivas con kDNA que amplificaron para el gen ME.

	N	Infección <i>T. cruzi</i> (%)	Infección TcI	N	Infección TcII	N	Infección mixta	N
Hembra	33	75.8	64.0%	16	12.0%	3	8.0%	2
Macho	24	54.2	69.2%	9	15.4%	2	7.7%	1
5N	10	90.0	55.6%	5	0	0	0.0%	0
4N	6	83.3	40.0%	2	40.0%	2	40.0%	2
3N	1	100.0	0	0	100.0%	1	0.0%	0
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>71.6</b>	<b>60.4%</b>	<b>32</b>	<b>15.1%</b>	<b>8</b>	<b>9.4%</b>	<b>5</b>

Cuadro 5. Fuente sanguínea e infección de *T. pallidipennis* con *T. cruzi* recolectados al exterior de la boca de la cueva “El Salitre”, según etapa del insecto. Infección con TcI, TcII e infecciones mixtas están anotados para las muestras que amplificaron con el gen ME.

Etapa	N	FS	Infección <i>T. cruzi</i>	Infección TcI		Infección TcII		Infección mixta	
Hembra	9	ND	66.7%	83.3%	5	33.3%	2	16.7%	1
	14	<i>Sylvilagus sp.</i>	100.0%	50.0%	7	14.3%	2	7.1%	1
Macho	7	ND	71.4%	60.0%	3	0.0%	0	0.0%	0
	6	<i>Sylvilagus sp.</i>	100.0%	66.7%	4	33.3%	2	33.3%	2
	1	<i>B. musculus</i>	100.0%	100.0%	1	0.0%	0	0.0%	0
N5	4	ND	100.0%	50.0%	2	0.0%	0	0.0%	0
	5	<i>Sylvilagus sp.</i>	100.0%	80.0%	4	20.0%	1	20.0%	1
	1	<i>P. melanophrys</i>	0.0%	-	0	0.0%	0	-	0
N4	4	ND	100.0%	50.0%	2	50.0%	2	50.0%	2
	1	<i>Sylvilagus sp.</i>	100.0%	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0
	1	<i>Sigmodon sp.</i>	100.0%	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	0
N3	1	ND	100.0%	0.0%	0	100.0%	1	0.0%	0

Un factor importante que puede sesgar los resultados de diagnóstico de *T. cruzi* o de la identificación de fuente sanguínea, es el estatus alimenticio de las chinches. Las chinches recolectadas fueron agrupadas según tuvieron contenido intestinal o no (Cuadro 6). Los organismos del grupo 1 que no tenían contenido intestinal tuvieron una infección significativamente más baja que los grupos que fueron analizados tanto para el tubo digestivo como para el contenido intestinal. El análisis del contenido intestinal favorece la amplificación del gen ME, sin duda por contener mayor cantidad de organismos. Asimismo, hubo significativamente mayor detección de linaje TcII en el contenido intestinal, así como de las infecciones mixtas, que con el tubo digestivo.

### Variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi*

El análisis de distancias genéticas indicó que las secuencias obtenidas se asocian a dos haplotipos de *T. cruzi* de acuerdo con la clasificación de Herrera y

colaboradores, (2009), 32 secuencias se encuentran asociadas a TcI sublinaje TcIa y ocho secuencias a TcII sublinaje TcIIe.

Cuadro 6. Eficacia de detección de *T. cruzi* en el contenido intestinal vs el tubo digestivo de *T. pallidipennis*. G1 es el grupo de chinches que no tuvieron contenido intestinal y solo fue procesado el tubo digestivo, y G2 es el grupo de chinches que tuvieron contenido intestinal y fue procesado por separado el contenido y el tubo digestivo.

	<b>Infección <i>T. cruzi</i></b>	<b>TcI</b>	<b>TcII</b>	<b>Mixto</b>
G1	55.2 (29)	50.0 (8)	6.3 (1)	0
G2	84.4 (45)	57.9 (22)	23.7 (9)	18.4 (7)
Pos TD/Pos CE	44.7 (17)	70.6 (12)	23.5 (4)	17.6 (3)
Pos TD/Neg CE	7.9 (3)	0	0	0
Neg TD/Pos CE	47.4 (18)	55.6 (10)	27.8 (5)	22.2 (4)

### **Análisis genético para poblaciones de TcI**

Se analizaron un total de 32 secuencias de muestras de TcIa de la cueva “El Salitre”, teniendo una longitud de 213 nucleótidos (Cuadro 7). El número de sitios polimórficos fue de 30% y el número de haplotipos fue de 14. La diversidad haplotípica fue alta ( $hd=0.810\pm 0.055$ ), mientras que la diversidad nucleotídica y el índice de polimorfismo nucleotídico fueron bajos ( $\pi=0.00169\pm 0.004$ ;  $q=0.0035\pm 0.0123$ , respectivamente). Las pruebas de neutralidad dieron resultados significativos (Fu and Li,  $D=-3.24189$ ,  $F=-3.46234$  y Tajima  $D=-2.30164$ ) (Cuadro 7), todos con signo negativo, indicando procesos de expansión poblacional, lo cual concuerda con el análisis de mismatch ( $Ssd=0.02904$ ,  $p=0.631$ ;  $r=0.05431$ ,  $p=0.6539$ ). Asimismo, mostró un patrón multimodal característico de poblaciones subdivididas.

Para el análisis de las muestras de diferentes localidades del estado de Morelos, se consideraron un total de 46 secuencias de TcIa, teniendo una longitud de 213 nucleótidos. El número de sitios polimórficos fue de 42% y el número de haplotipos

fue de 14. La diversidad haplotípica fue alta del ( $hd= 0.746\pm 0.049$ ), mientras que la diversidad nucleotídica y el índice de polimorfismo nucleotídico fueron bajos ( $\pi=0.0160\pm 0.0038$ ;  $q=0.04617\pm 0.01456$ , respectivamente). Las pruebas de neutralidad dieron resultados significativos (Fu and Li,  $D=-4.44441$ ,  $F=-4.42198$  and Tajima  $D= -2.40153$ ) (Cuadro 7). Todos con signo negativo indicando procesos de expansión poblacional, lo cual concuerda con la distribución unimodal entre pares de las diferencias nucleotídicas ( $Ssd=0.01763$ ,  $p=0.67$ ;  $r=0.0524$ ,  $p=0.7229$ ).

Los valores de  $F_{st}$  (Índice de fijación) en la comparación de la diversidad genética de la cueva y el hábitat doméstico del estado de Morelos fue 0.04166 y el valor de  $F_{st}$  entre el Tcl de la cueva y el Tcl del hábitat silvestre y ecotono del estado de Morelos fue de 0.06385. En ambos casos el valor indica que existe mínima diferencia entre estos ambientes y que la diferenciación se está observando dentro de cada población analizada y no entre ellas.

### **Análisis genético para poblaciones de TcVI**

Se analizaron ocho secuencias de muestras de TcVI de la cueva “El Salitre”, la longitud del fragmento del mini exón fue de 153 nucleótidos. El número de sitios polimórficos fue de 21% y el número de haplotipos fue de 6. La diversidad haplotípica fue alta del ( $hd= 0.893\pm 0.0111$ ), mientras que la diversidad nucleotídica y el índice de polimorfismo nucleotídico fueron bajos  $\pi=0.03955\pm 0.01325$ ;  $q=0.05436\pm 0.0256$ , respectivamente. Las pruebas de neutralidad no dieron resultados significativos (Fu and Li,  $D=-1.50347$ ,  $F=-1.6555$  and Tajima  $D=-1.42184$ ) (Cuadro 7). El análisis de Mismatch muestra una distribución multimodal aunque el índice de SSD mostró expansión poblacional a diferencia del índice de  $r$  ( $Ssd= 0.12038$ ,  $p= 0.1777$ ;  $r= 0.37117$ ,  $p= 0.0387$ ), lo cual puede deberse a que pocas muestras comparten el mismo haplotipo (6 haplotipos de 8 analizadas), lo cual se espera en poblaciones constantes.

Cuadro 7. Muestra la Diversidad genética de *T. cruzi* de la cueva “El Salitre” y de ocho localidades del estado de Morelos.  $\eta$  = número total de mutaciones, S= número de sitios polimórficos, Su= número de sitios únicos, K= número promedio de diferencias nucleotídicas, h= número de haplotipos, Hd= diversidad haplotípica,  $\pi$ = índice de diversidad nucleotídica,  $\Theta$ = índice de polimorfismo nucleotídico, D y F de Fu y Li = estimadores de neutralidad, y D de Tajima.

Población	Número de secuencias	$\eta$	S	Su	K	H	Hd $\pm$ de	$\pi \pm$ de	$\Theta \pm$ de	Fu y Li's		Tajima
										D	F	D
<b>Tcl (s)</b>	32	39	30	210	3,556	14	0,810 $\pm$ 0,055	0,01694 $\pm$ 0,004	0,03547 $\pm$ 0,01233	-3,24189	-	-
<b>Tcl (M)</b>	46	47	42	207	3,312	14	0,746 $\pm$ 0,049	0,01600 $\pm$ 0,00381	0,04617 $\pm$ 0,01456	-4,44441	3,46234	2,30164
<b>TcVI (S)</b>	8	21	21	149	5,893	6	0,893 $\pm$ 0,111	0,03955 $\pm$ 0,01325	0,05436 $\pm$ 0,0256	-1,50347	4,42198	2,40153
<b>TcVI (M)</b>	7	29	28	146	13,143	5	0,905 $\pm$ 0,103	0,09002 $\pm$ 0,02405	0,07828 $\pm$ 0,03735	1,17229	1,65155	1,42184
<b>TcVI (M)</b>	7	29	28	146	13,143	5	0,905 $\pm$ 0,103	0,09002 $\pm$ 0,02405	0,07828 $\pm$ 0,03735	1,17229	1,16011	0,62885

\*P  $\leq$  0.05

Figura 4. Árbol obtenido bajo el criterio de distancias con el método Neighbor Joining, basado en secuencias parciales del gen mini-exón (213 pb) de TcI y TcII. Creado en el programa MEGA v. 6.

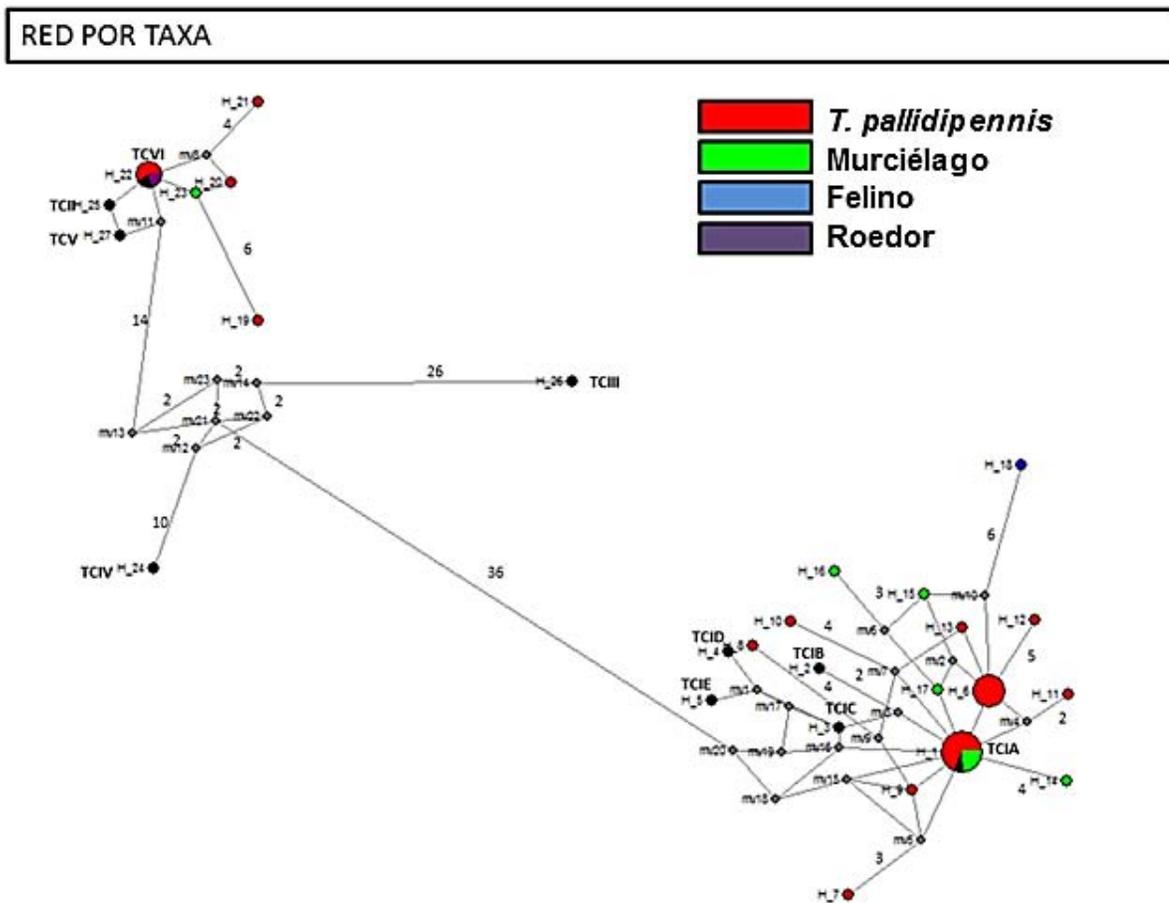


Se analizaron 7 secuencias de TcII con una longitud de 153 pb. El número de sitios polimórficos fue de 28 y el número de haplotipos fue 5. La diversidad haplotípica fue alta del ( $hd= 0.905\pm 0.0103$ ), mientras que la diversidad nucleotídica y el índice de polimorfismo nucleotídico fueron bajos ( $\pi=0.09002\pm 0.002405$ ;  $q=0.07828\pm 0.03735$ , respectivamente). Las pruebas de neutralidad dieron resultados no significativos (Fu and Li,  $D=1.17229$ ,  $F=1.16011$  and Tajima  $D=0.62885$ ). El análisis de mismatch mostró una distribución multimodal lo cual puede deberse a que pocas muestras comparten el mismo haplotipo (5 haplotipos de 7 analizados). Solo presentó señal de expansión poblacional con el índice de  $r$  ( $Ssd=0.99773$ ,  $p=0$ ,  $r=0.37293$ ,  $\rho=0.955$ ).

### **Análisis de redes de haplotipos**

Se reconstruyeron las redes de haplotipos por taxa, ya que todas las secuencias pertenecen a la cueva “El Salitre” y al mismo hábitat (ecotono). La red muestra dos haplotipos para TcI, que corresponderían al DTU TcIa según la clasificación de Herrera *et al.*, (2009) y un haplotipo mayoritario para linaje 2 que correspondería al DTU TcVI. El análisis indica que los murciélagos llevan el DTU TcIa, pero no el TcVI y en mamíferos no voladores se encuentra principalmente el TcVI y una pequeña porción del DTU TcIa (Figura 5). Se identificó un haplotipo TcIa que se comparte en nueve insectos y tres murciélagos, el haplotipo 6 es exclusivo de insectos que no comparte con ningún mamífero y se identificaron 12 haplotipos individuales; siete de insectos, cuatro de murciélagos y uno exclusivo en *F. catus*.

Figura 5. Red de haplotipos de *T. cruzi* según taxa colectada dentro o inmediatamente fuera de la boca de la cueva “El Salitre”.



### **Determinación de fuente sanguínea**

De los 45 insectos que presentaron contenido estomacal, en 38 se obtuvieron secuencias de fuente sanguínea animal. En los resultados del Blast, se reconocieron 29 secuencias compatibles con *Silvilagus sp*, una de *Sigmodon sp*, una de *Peromyscus sp*, una de *B. musculus* y una de *F. catus*, finalmente 5 secuencias fueron no informativas al no presentar homología con ningún mamífero registrado en la base de datos genética.

## **DISCUSIÓN**

La Organización Mundial de Salud (OMS) reporta que 100 millones de personas en toda América Latina están en riesgo de contraer la enfermedad, y se calcula que entre 16 y 18 millones de personas están infectadas con *T. cruzi* (Storino *et al.*, 2002; Dumonteil, 2004). En México aproximadamente 1.8 millones de personas están infectadas con el parásito y alrededor de 69000 individuos/año están en contacto con *T. cruzi*. Se estima que en el estado de Morelos al año fallecen 350 personas por la enfermedad y que hay un mínimo de 15,000 personas seropositivas a *T. cruzi*. (Ramsey *et al.*, 2003). El mantenimiento de esta zoonosis en ambientes silvestres o de ecotono, y la conectividad de estos con el hábitat doméstico humano, sede principal de contaminación del humano con el parásito, son los factores principales de riesgo para la transmisión de la enfermedad de Chagas a la población humana.

Las cuevas son consideradas como ecotipos silvestres fundamentales para la comprensión epidemiológica de *T. cruzi* (Guhl *et al.*, 2007). El uso de una cueva como refugio depende, además de su disponibilidad, de las condiciones físicas, topográficas y microclimáticas que hay en ellas (Ávila y Medellín, 2004; Ladle *et al.*, 2012; Solano, 2003). Las cuevas y su medio externo forman un sistema complejo, desde el intercambio de materia y energía que se produce a través de corrientes de agua, filtración, vientos, sedimentación, o fenómenos biológicos como el

movimiento de animales y el intercambio de nutrimentos por árboles que desarrollan raíces dentro de la cueva (Arita, 1994). Algunos de los factores que influyen en la variación de la temperatura de una cueva son la interacción entre la estructura de la cueva y el intercambio del flujo de aire, así como la cantidad y variedad de organismos que la habitan o usan (Ávila y Medellín, 2004; Pekins, 2006). La complejidad de las cuevas es ocasionada por diversos factores como el tamaño de la entrada, elevación entre las entradas, techos y bóvedas, la presencia de grandes cámaras, techos ásperos para grandes congregaciones (Espinosa, 1994). La cueva “El Salitre” cuenta con una sola entrada, con filtraciones de agua, sin corrientes de aire, sectores de la cueva pueden presentar inundaciones temporales, la cueva alcanza los 225 metros de profundidad con amplias dimensiones que van de 2 a 6 metros de altura y un rango del ancho de 4 a 12 metros, lo que la convierte en una de las cuevas más grandes e importantes del estado de Morelos. Los parámetros físicos que se obtuvieron durante el muestreo fueron constantes, el micrositio marcado como entrada en el que se contaban los primeros 30 metros de profundidad, mantuvo condiciones similares al exterior, en este sitio se presentaron los niveles más altos de intensidad de luz con 4lm-s y de temperatura con 25°C y el nivel más bajo de humedad relativa con el 79%, no se observaron grupos de murciélagos perchados en esta zona de la cueva, tal vez influye la tolerancia de las especies que habitan la cueva hacia la luz presente en este sitio. La cámara 1 reportó una intensidad de luz de 1lm-s, su temperatura fue de 20°C y su porcentaje de humedad relativa fue de 99%, en época de lluvias este sector de la cueva se inunda parcialmente limitando el acceso a la misma, en esta cámara se observaron solo perchas de *A. hirsutus* y *G. soricina* ambas especies utilizan esta zona de la cueva para formar harenes, sin embargo individuos de estas especies también perchán en otras zonas de la cueva pero no forman harenes (Monter, 2013). El resto de la cueva mostró condiciones físicas similares, la cámara tres se encuentra inundada permanentemente y la cámara dos y el pasillo dos presentan inundaciones temporales, intensidad de luz es de 0lm-s a excepción de la cámara dos donde se registró una intensidad de luz de 1lm-s a pesar de ser la zona más profunda de la

cueva, probablemente se debe a la presencia de raíces incrustadas en la formación rocosa de la cueva y que estas permitan el ingreso de la luz.

Los murciélagos son considerados uno de los grupos más sociales de mamíferos. Muchas especies de murciélagos duermen juntos en colonias muy grandes y densas. Esta densa agrupación de individuos ofrece amplias oportunidades para el intercambio de patógenos, debido a los altos niveles de contacto entre las distintas especies o entre las poblaciones de murciélagos (Woo *et al.*, 2009; Kuzmin *et al.*, 2011). En el presente estudio las cinco especies perchan dispersas en la cueva y todas forman grupos pequeños de entre 10 y 20 individuos por percha, a diferencia de *M. velifer* que forma una colonia de maternidad muy grande y que perchan en grupos de más de 100 individuos. Lo anterior puede explicar que todas las especies de murciélagos que habitan en la cueva presenten infección de *T. cruzi*. Al agruparse los murciélagos irradian mayor cantidad de calor y dióxido de carbono, lo que puede atraer a los vectores con mayor facilidad. No hubo diferencia significativa entre las prevalencias de infección de cada especie, lo que sugiere que el vector presente en la cueva es generalista. En cambio, el gremio trófico de los insectívoros presentó mayor tasa de infección, es difícil probar que la transmisión ocurre por ingesta, sin embargo no se descarta. Es probable que sea un sesgo en el muestreo ya que el número de insectívoros colectados fue mayor al número de nectarívoros o frugívoros y por lo tanto no se tiene la tasa real de estos nichos tróficos.

Las tasas de infección reportadas en este trabajo para *P. parnellii* y *G. soricina* son similares a las reportadas previamente en la comunidad de Ticumán, donde ambas especies son abundantes, por lo que se consideran como especies hospedadoras importantes en la dinámica de transmisión de *T. cruzi* (Villegas-García y Santillán-Alarcón, 2001). En el municipio de Jiutepec se reportó una prevalencia de 50% para *L. yerbabuena* la cual es mayor a la encontrada en este estudio, probablemente la diferencia en las prevalencias se debe a que las colectas se realizaron en distintas épocas del año. Las prevalencias de los murciélagos reportadas en este estudio fueron altas y contrastan con lo reportado en Chalcatzingo, Morelos, donde las

prevalencias de infección fueron nulas con la posibilidad de que la infección esté presente en proporción baja y que el esfuerzo de muestreo no fue el adecuado (Ramsey *et al.*, 2012).

El género *Artibeus* es uno de más comunes en el Neotrópico y varias especies de este han sido frecuentemente reportadas con infección por *T. cruzi* en México y Sudamérica, la mayoría de las especies del género presenta afinidad por cuevas y arboles huecos para perchar y ahí es donde entra en contacto con los vectores (Marinkelle, 1982; Pinto y Bento, 1986; Villegas-García y Santillán-Alarcón, 2001; Kunz *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2013). La especie *A. hirsutus* no había sido reportada con infección de *T. cruzi* en el estado de Morelos o en el resto del país, esto se debe a que se trata de una especie bajo cuidado especial y es endémica de México con distribución restringida a una pequeña franja del pacífico que se extiende a la Faja Transmexicana (Téllez-Girón, 2005). En este estudio la colecta de *A. hirsutus* estuvo limitada a 57 individuos, de los cuales 16 fueron sacrificados después de tomarles muestra de sangre y a los 41 individuos restantes solo se les tomó una muestra de sangre. Con estas muestras se estimó una prevalencia de 15.8%. La sangre parece ser un buen parámetro para efectos de diagnóstico de *T. cruzi*, en cambio no fue informativa en los análisis de linajes tal vez por baja carga parasitaria presente en su sangre.

Las especies del género *Myotis*, incluyendo *M. velifer*, son afines a cuevas, donde pueden llegar a formar colonias de miles de individuos. Este género está comúnmente relacionado con los tripanosomas, han sido reportados como reservorios de *T. cruzi*, así como de otros tripanosomas. (Castro-Campillo *et al.*, 2005; Fuentes-Vargas, 2011; Hamilton *et al.*, 2012a,b; Ramírez *et al.*, 2013). Las prevalencias de infección registradas en el mes de mayo de 2012 y mayo de 2014 indican que las tasas interanuales se mantienen de manera similar al menos en ese mes. Sin embargo las tasas de infección durante el mes de marzo de 2014, fueron mayores, lo anterior se puede asociar a que los *Myotis* provienen de distintos refugios hasta el momento desconocidos, al igual que las condiciones y su

exposición a vectores que estén presentes ellos. En conjunto la prevalencias de infección de *Myotis velifer* son mayores a las registradas para *M. keaysi* en la comunidad de Zho Laguna, Campeche donde reportan una prevalencia del 20%, es probable que los tamaños de las colonias entre una y otra especie sea la razón de que las prevalencias sean diferentes, teniendo mayor probabilidad de infectarse aquellas especies que perchen en grupos más numerosos (López-Cansino *et al.*, 2015). Respecto a las tasas de TcI y TcII obtenidos en *Myotis* fueron similares, con excepción de mayo de 2014 donde no se encontró TcI, en el resto se registraron infecciones mixtas.

El número de colecta de roedores fue bajo, y solo *B. musculus* y *P. melanophrys* presentaron infección, en ambos casos se presentaron infecciones mixtas de TcI y TcII, con tasas de prevalencia similares a las reportadas en una comunidad cercana a la cueva. En ese estudio varias especies de roedores (*P. melanophrys*, *B. musculus*, *N. mexicana* y *L. irroratus*) tuvieron prevalencia de 30% (Villegas-García y Santillán-Alarcón, 2001). En el municipio de Jiutepec se registró la presencia de *T. cruzi* en ratones de las especies (*R. rattus*, *P. melanophrys*, *L. irroratus*, *B. musculus* y *M. musculus*) con porcentajes de infección de hasta el 50%. En la localidad de Chalcatzingo, Morelos, se reportaron siete especies de ratones infectados por *T. cruzi*, donde las especies abundantes como *S. hispidus*, *L. irroratus*, *M. musculus* y *P. levipes*, presentaron una prevalencia de 62% de infección mientras que especies de menor abundancia como *B. musculus* y *R. rattus* presentaron una prevalencia de 30% (Ramsey *et al.*, 2012). Finalmente, Montes (2014), realizando una mayor recolecta, reportó prevalencias en *B. musculus* y *P. melanophrys* de 4% y 8%, siendo estas bajas en comparación con las obtenidas en la cueva de 33.3% y 75% respectivamente.

Estudios sobre la prevalencia de *T. cruzi* en mamíferos del estado de Morelos han sugerido que los mamíferos no voladores, como marsupiales, carnívoros y roedores son reservorios importantes del parásito y que probablemente juegan un papel relevante en la dinámica de transmisión de *T. cruzi*. En nuestro estudio las colectas

de mamíferos no voladores fueron bajas, sin embargo se pudo observar prevalencias altas en las especies mejor representadas, confirmando su importancia en los ciclos de transmisión (Villegas-García y Santillán-Alarcón, 2001 y 2004; Ramsey *et al.*, 2012; Montes, 2014). Los marsupiales sudamericanos son frecuentemente reportados con altas prevalencias de *T. cruzi*, su interacción es tan estrecha que pueden transmitir el parásito por medio de glándulas anales y se reconoce como mamífero sinantrópico que puede acercarse a las viviendas humanas, actuando como vínculo entre la transmisión en ambientes selváticos y domésticos (Noireau *et al.*, 2009; Hamilton *et al.*, 2012a). En el presente estudio se colectó un individuo de la especie *D. virginiana* y fue positivo por lo que su prevalencia es del 100%. En el municipio de Tlaltizapan fue reportada una prevalencia de 87%, por sus altas prevalencias, los tlacuaches parecen desempeñar un rol importante en el flujo de *T. cruzi* entre las poblaciones silvestres y peridomésticas (Villegas-García y Santillán-Alarcón, 2001). El gato analizado presentó un haplotipo único que no comparte con ningún otro mamífero o chinche recolectado que probablemente lo adquirió en su sitio de descanso. Sin embargo estos animales de compañía juegan un papel secundario en el rol de la transmisión de *T. cruzi* sus prevalencias suelen ser bajas y se desconoce el potencial de transmisión que pueden tener, a diferencia de los perros que en áreas rurales suelen desplazarse por distintos ambientes (doméstico, ecotono y silvestre) y con ello mantener un flujo de infección en esos ambientes (Catalá *et al.*, 2004; Gürtler *et al.*, 2005).

La colecta de insectos se realizó en su mayoría en la periferia de la entrada, en este sitio se presenta una gran cantidad de dióxido de carbono que puede ser atractivo para las chinches del exterior, y como se describió anteriormente la temperatura registrada fue de 25°C y la humedad relativa de 79%. Estas condiciones físicas son óptimas para la cópula y el desarrollo de *T. pallidipennis* (Zavala *et al.*, 2008). Al interior de la cueva solo se colectó un individuo adulto, el cual fue hallado sobre la pared, a escasos 40 cm de una trampa Sherman que contenía un roedor. Al analizar

el insecto no tenía contenido intestinal, la necesidad de alimentarse puede ser la causa por la que se encontrara en un lugar visible. La baja colecta de insectos al interior de la cueva es posible que se deba a varios factores. 1) Las grietas presentes en la cueva que permiten crear galerías de insectos y es difícil poder extraerlas de esos lugares. 2) La alta disponibilidad de alimento presente en la cueva, principalmente en los techos donde perchan los murciélagos hace que el desplazamiento de las chinches sea menor. 3) El horario en que se realizó la búsqueda de chinches probablemente no coincidió con los horarios de actividad de estas (Zavala *et al.*, 2008). Hoffmann y colaboradores (1986) en su inventario faunístico reportó la presencia de chinches en varios micrositios dentro de la cueva, sin hacer mención a la época del año en la que fueron colectados. Este trabajo se realizó en la temporada de seca, periodo en el que los insectos adultos buscan reproducirse, por lo que es probable que los insectos puedan emerger a la superficie para realizar esta actividad y por tal motivo no se tuvo éxito en la colecta al interior de la cueva. Sin embargo todos los murciélagos tuvieron infección de *T. cruzi*, por lo que se puede asumir que hay contacto entre las chinches y los murciélagos. Será necesario en trabajos posteriores contemplar un muestreo invasivo para insectos que no afecte al resto de la fauna, como los piretroides sintéticos.

Las tasa de infección de *Triatoma pallidipenis* fue alta, al igual que distintas localidades del estado de Morelos, que han reportado tasas de infección que van de 66% a 88% (Cortés-Jiménez *et al.*, 1996). De los insectos colectados en este estudio, aquellos que se encontraron con contenido estomacal presentaron mayor tasa de infección con un valor de 84%, mientras que los que carecían del contenido estomacal presentaron una infección de 52%. Lo que sugiere que el contenido estomacal es de gran importancia para la detección de *T. cruzi*, es probable que esto suceda por que el parásito no se pega a las paredes del tubo digestivo.

En relación a la prevalencia asociada al sexo de los vectores, se encontraron diferencias significativas, las hembras presentaron una tasa de infección de 76% mientras que los machos presentaron una tasa de infección de 54%. Es probable

que la infección en hembras está ligado a factores reproductivos, ya que las hembras requieren consumir mayor cantidad de alimento para llevar a cabo la producción de huevos y la probabilidad de tener contacto con hospederos infectados será mayor. Las ninfas presentaron mayor tasa de infección que los adultos, lo cual es extraño ya que la infección una vez adquirida no se elimina y en cambio se acumula, por lo tanto se esperaría que un adulto tenga mayor probabilidad de estar infectado que una ninfa. Probablemente las ninfas colectadas se encontraban alimentándose de una fuente altamente infectada. Al analizar su fuente sanguínea se observó en un alto porcentaje se alimentan de conejos del género *Sylvilagus*, los cuales no pudieron ser recolectados para probar su alta infección.

La fuente alimenticia dominante en las 45 chinches analizadas, corresponde a conejos del género *Sylvilagus*, y solo cuatro chinches consumieron sangre distinta a esta. En una chinche se encontró sangre de *Sigmodon sp*, en otra se encontró sangre de *Peromyscus sp*, otra con sangre de *Felis catus*, y una última con sangre de *B musculus*. Los conejos son abundantes en la región, sin embargo no se pudieron colectar por respeto a los usos y costumbres de la localidad, ya que la gente que vive cerca de la cueva acostumbra a cazar conejos para autoconsumo. No se encontró sangre de murciélagos en las chinches debido a que la mayoría de ellas fueron colectadas en la boca de la cueva, este lugar es ocupado por roedores y lagomorfos para uso de madrigueras tal como se refleja en los resultados de fuente sanguínea y las perchas de murciélagos están aproximadamente a 40 metros las más cercanas.

Es notable la presencia predominante de TcI, por lo menos en esta región de México, en comparación con lo que se había reportado anteriormente y que circula en los ciclos domésticos y silvestres. Es el DTU con mayor virulencia y ha sido asociado con casos humanos en la cuenca del Amazonas. Considerado como una de los DTU más raros, TcVI ha sido reportado principalmente en América del Sur, con escasos reportes en México y Estados Unidos. Asociado a ciclos silvestres (Carrasco *et al.*, 2013; López-Cancino *et al.*, 2015).

## CONCLUSIONES

La cueva El Salitre presenta condiciones microclimáticas que benefician la transmisión vectorial de *T. cruzi*, por lo que la mayoría de los mamíferos que la habitan se encontraron infectados. La entrada de la cueva representa un microambiente importante en la transmisión de *T. cruzi*. En este sitio ocurre la transición microclimática y la densidad de triatóminos fue evidente.

Los murciélagos contribuyen a la circulación *T. cruzi* dentro y fuera de la cueva “El Salitre” con sus movimientos estacionales permiten fluctuaciones en las prevalencias de infección. Las prevalencias de los murciélagos cavernícolas analizados en este trabajo, son mayores a las reportadas previamente en el estado de Morelos. Se reporta por primera vez a *Artibeus hirsutus* y *Myotis velifer* como reservorios de *T. cruzi*, su importancia en los ciclos de transmisión se conocerá una vez que se vayan documentando más reportes de infección en otras áreas o ambientes.

El murciélago *Myotis velifer* es el mamífero con mayor importancia en la transmisión de *T. cruzi* en la cueva de “El Salitre”. Su abundancia, sus migraciones locales y sus agrupaciones numerosas, benefician al mantenimiento y flujo de las poblaciones del parásito dentro y fuera de la cueva.

Es importante realizar una mayor recolecta de mamíferos no voladores y solicitar a los ejidatarios y cazadores del lugar la donación de tejido de los conejos que cazan. Con la finalidad de entender su importancia en la transmisión de *T. cruzi*. También se sugiere realizar una recolecta de triatóminos dentro de la cueva, principalmente en los lugares donde perchan los murciélagos. Así como ampliar el área de muestreo al exterior de la cueva, donde se incluya toda la superficie de la cueva.

Se registró la presencia de los DTUs TcI y TcVI. Sin embargo, será importante considerar la opción de utilizar distintos marcadores moleculares, con la intención de obtener una mayor información sobre la estructura genética de las poblaciones de *T. cruzi*, así como la posible identificación de otros tripanosomas.

## LITERATURA CITADA

- Álvarez-Castañeda, S. T. (1996). Los Mamíferos del estado de Morelos. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., 210 pp.
- Añez, N., G. Crisante, P. J. Soriano (2009). *Trypanosoma cruzi* congenital transmission in wild bats. *Acta Tropica* 109:78–80.
- Arita, H. T. (1994). La vida bajo la Tierra. *Revista Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM* 36:50-58.
- Ávila, F. R. y R. A. Medellín (2004). Ecological, taxonomic, and physiological correlates of cave use by Mexican bats. *Journal of Mammalogy* 85(4):675–687.
- Barnabe, C., S. Brisse y 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 Genetic and Evolution* 2:201–208.
- Bautista, N. L., G. S. De La Torre, I. H. Arteaga y P. M. S. Schettino (1999). Importance of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) as a Vector of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the State of Morelos, Mexico, and Possible Ecotopes. *Journal of Medical Entomology* 36(3):233-5.
- Bonet, F. (1971). Espeleología de la región de Cacahuamilpa, Guerrero: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geología, Boletín 98pp.
- Botero, L. A., A. M. Mejía y O. Triana (2007). Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. *Biomédica* 27(1):64-74.

- Brenière, S. F., B. Taveira, M. F. Bosseno, R. Ordoñez y F. Lozano-Kasten (2003). Preliminary Results of Random Amplification of Polymorphic DNA among Triatominae of the Phyllosoma Complex (Hemiptera, Reduviidae). *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 98(8):1033-1038.
- Carrasco, H. J., A. J. Nessi, J. C. Londono, A. E. Moleiro y I. Mendoza (2013). Molecular epidemiology of chagas disease in Venezuela. *Soj Microbiol and Infectious Diseases* 1:1-6
- Castro-Campillo, A. E. González, U. Aguilera y J. Ramírez-Pulido (2005). *Myotis velifer*, en Los mamíferos silvestres de México. Ceballos, G. y Oliva, G. (eds). Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 988pp.
- Catalá, S. S., L. B. Crocco, A. Muñoz, G. Morales, I. Paulone, E. Giraldez, C. Candiotti y C. Ripol (2004). Entomological aspects of Chagas' disease transmission in the domestic habitat, Argentina. *Revista Saúde Pública* 38:216–222.
- Cavazzana jr, M., A. Marcili, L. Lima Y F. Maia Da Silva (2010). Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (SSU rRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *International Journal for Parasitology* 40:345–355.
- Cohen, J. E. y R. E. Gürtler (2001). Modeling household transmission of American Trypanosomiasis. *Science* 29:694–698.
- Cohen, J. M., M. L. Wilson, A. Cruz-Celis, R. Ordoñez, J. M. Ramsey (2006). Infestation by *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Is Associated with Housing Characteristics in Rural Mexico. *Entomological Society of America* 43:1252-1260.

- Colwell, R. (2012). Estimates: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Versión 8.2. Department of Ecology and Evolutionary Biology. University of Connecticut, E.E.U.U.
- Cortés-Jiménez, M., B. Noguera-Torres, R. Alejandre-Aguilar, L. Isita-Torneli, y E. Ramírez-Moreno (1996). Frequency of triatomines infected with *Trypanosoma cruzi* collected in Cuernavaca city, Morelos, México. *Revista Latinoamericana Microbiológica*. 38:115-119.
- De la Fuente A. L., A. Dias-Lima, C. M. Lopes, L. Emperaire, A. Walter, A Ferreira, I. Sherlock y F. Noireau (2008). Behavioral plasticity of triatominae related to habitat selection in northeast Brazil, *Journal. Medical. Entomology* 45:14–19.
- Dumonteil E. y S. Gourbière (2004). Predicción de la abundancia y tasa de infección de *Triatoma dimidiata*: un mapa de riesgo de transmisión natural de la enfermedad de Chagas en la Península de Yucatán, México. *Revista Biomédica* 15:221-231.
- Enger, K. S., R. Ordoñez, M. L. Wilson y J. Ramsey (2004). Evaluation of Risk Factors for Rural Infestation by *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Triatominae), a Mexican Vector of Chagas Disease. *Journal of Medical Entomology* 41(4):760-767
- Espinoza, R. (1994). Origen y distribución de las cavernas de México. *Revista. Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM* 36:45-49.
- Excoffier, L. y H. E. L. Lischer (2010). Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10:564-567.
- Fernandes, O., N. Sturm, R. Derré y D. Campbell (1998). The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Biochemical Parasitology* 95: 129-133.

- Fries, C. Jr. (1960). Geología del estado de Morelos y de partes adyacentes de México y Guerrero, Región central Meridional de México. Boletín del Instituto de Geología 60-236pp.
- Fuentes-Vargas. L. (2011). Tamaño y composición de dos colonias de maternidad del murciélago *Myotis velifer* en el estado de Morelos (tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México 43pp.
- Galán, C. (1993). Fauna hipogea de Guipúzcoa: su ecología, biogeografía y evolución. Munibe (Ciencias Naturales - Natur Zientziak) San Sebastian, España. 160pp.
- Giannini, N. P. y Kalko, E. K. V. (2004). Trophic structure in a large assemblage of phyllostomid bats in Panama. *Oikos* 105:209-220.
- Guhl F., G. Aguilera, N. Pinto y D. Vergara (2007). Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatóminos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. *Biomédica* 27:43-62.
- Gürtler, R. E., M. C. Cecere, M. A. Lauricella, R. M. Petersen, R. Chuit, E. L. Segura y J. E. Cohen (2005). Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73:95–103.
- Hall, T. (2004). BioEdit. Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, 92008, E.E.U.U. (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).
- Hamilton P. B, M. D. Lewis, C. Cruickshank Y M. W. Gaunt, M. Yeo, M. S. Llewellyn, S. A. Valente, F. Maia Da Silva, J. R. Stevens, M. A. Miles Y M. M. G. Teixeira (2011). Identification and lineage genotyping of South American

- trypanosomes using fluorescent fragment length barcoding. *Infection Genetic and Evolution* 11:44–51.
- Hamilton, P. B., C. Cruickshank, J. R. Stevens, M. G. Teixeira y F. Mathews (2012a). Parasites reveal movement of bats between the new and old worlds. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63:521-526.
- Hamilton, P. B., M. M. Teixeira y J. R. Stevens (2012b). The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the “bat seeding” hypothesis. *Trends Parasitol* 28(4):136-141.
- Herrera, C., F. Guhl, A. Falla, A. Fajardo, M. Montilla, G. A. Vallejo, y M. D. Bargues (2009). Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences.
- Hoffmann, A., J. G. Palacios-Vargas y J. B. Morales-Malacara (1986). Manual de bioespeleología (con nuevas aportaciones de Morelos y Guerrero, México). Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 274pp.
- Jiménez-Valverde. A. y J. Hortal (2003). Las curvas de acumulación de especies y la necesidad de evaluar la calidad de los inventarios biológicos. *Revista Ibérica de Aracnología*. 8:151-161.
- Kunz, T. H., E. B. Arnett, B. M. Cooper, W. P. Erickson, R. P. Larkin, T. Mabee, M. L. Morrison, M. D. Strickland, y J. M. Szewczak (2007). Assessing Impacts of Wind-Energy Development on Nocturnally Active Birds and Bats: A Guidance Document. *Journal of Wildlife Management* 71(8):2449–2486.
- Kuzmin, I. V., A. S. Turmelle, B. Agwanda, W. Markotter, M. Niezgodá, R. F. Breiman y C. E. Rupprecht (2011). Commersoni’s leaf-nosed bat (*Hipposideros commersoni*) is the likely reservoir of Shimoni bat virus. *Vector Borne Zoonoses and Diseases*. 11:1465–1470.

- Ladle, L. J., J. V. L. Firmino, A. C. M. Malhado y A. Rodríguez-Durán (2012). Unexplored Diversity and Conservation Potential of Neotropical Hot Caves. *Conservation Biology* 26(6):978–982.
- Lazcano, C. (1983). México, paraíso de la espeleología. *Gaceta U.N.A.M.* VI época. 1:21pp.
- Legey, A. P., P. A. Pinho, S. C. Xavier, R. Marchevsky, J. C. Carreira, L. L. León, A. M. Jansen (2003). *Trypanosoma cruzi* in marsupial didelphids (*Philander frenata* and *Didelphis marsupialis*): differences in the humoral immune response in natural and experimental infections. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(2):241-248.
- Lent, H. y P. Wygodzinsky (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163:127-520.
- Lima, L., F. M. Da Silva, L. Neves, M. Attias, S. A. Takata, M. Campaner, W. De Souza, P. B. Hamilton y M. M. G. Texeira (2012). Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: Morphological, Developmental and Phylogenetic Evidence of a New Species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African Bats Closely Related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and Allied Species. *Protist* 163:856–872.
- Lisboa, C. V., S. C. Xavier, H. M. Herrera y A. M. Jansen (2009). The ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: dispersión of zymodeme 3(Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. *Veterinary parasitology* 166:19-24.
- López-Cancino, S. A., E. Tun-Ku, H. K De la Cruz-Felix, C. N. Ibarra-Cerdeña, A. Izeta-Alberdi, A Pech-May, C. J. Mazariegos-Hidalgo, A. Valdez-Tah, J. M. Ramsey (2015). Landscape ecology of *Trypanosoma cruzi* in the southern Yucatan Peninsula. *Acta Tropica* 151:58-72.

- Marcili, A., L. Lima, M. J. Cavazzana, A. C. V. Junqueira, H. H. Veludo, F. Maia Da Silva, M. Campaner, F. Paiva, V. L. B. Nunes, M. M. G. Teixeira (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* 136:641–655.
- Marinkelle, C. J. (1982). Prevalence of *Trypanosoma cruzi*-like infection of Colombian bats. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 76:125–134.
- Medellín, A. R., T. H. Arita, y H. O. Sánchez (2008). Identificación de los murciélagos de México, clave de campo. Segunda edición. Asociación Mexicana de Mastozoología, A. C. México, D. F. 78pp.
- Medina-Torres, I., J. C. Vázquez-Chagoyán, R. I Rodríguez-Viva y R. Montes De Oca-Jiménez (2010). Risk factors associated with triatomines and its infection with *Trypanosoma cruzi* in rural communities from the southern region of the state of México. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82:49–54.
- Molyneux, D. H. (1991). Tripanosomes of bats. In *Parasitic Protozoa*, 2nd Edn, (ed. Kreier, J. P. y Baker, J. R.), pp. 195–223. Academic Press, London, UK.
- Monter, R. M. (2013) Interacciones sociales en harems del murciélago *Artibeus hirsutus* (chiroptera: phyllostomidae). (Tesis de maestría). Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México 46pp.
- Montes, C. L. M. (2014). Diversidad de ratones y prevalencia de *T. cruzi* en ambientes de ecotono y remanentes naturales en el estado de Morelos (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos 54pp.

- Mota, J., J. C. Chacon, A. E. Gutiérrez-Cabrera, V. Sánchez-Cordero, R. A. Wirtz, R. Ordoñez, F. Panzera y J. Ramsey (2007). Identification of Blood Meal Source and Infection with *Trypanosoma cruzi* of Chagas Disease Vectors Using a Multiplex Cytochrome b Polymerase Chain Reaction Assay. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 7(4):617-627.
- Noireau, F., P. Diosque y A. M. Jansen (2009). *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary research*. 40(26):1-23.
- Pekins, C. E. (2006). Cave *Myotis* Bat Population and Cave Microclimate Monitoring at a Maternity Site on Fort Hood, Texas during 2005-2006, en: *Endangered species monitoring and management at Fort Hood, Texas: 2006 annual report*. The Nature Conservancy, Fort Hood Project, Fort Hood, Texas, E.E.U.U. 117-224pp.
- Peralta-Rodríguez, J. L. (2009). Helminths Parasites of *Pteronotus parnellii* (Chiroptera: Mormoopidae) en la Cueva “El Salitre”, Emiliano Zapata, Morelos. (Tesis de licenciatura) Facultad de Ciencia Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. 111pp.
- Pinto, A. S. y D. N. Bento (1986). *Trypanosoma cruzi*-like bloodstream trypomastigotes in bats from the state of Piauí, northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 19:31–34.
- Pinto, C. M., E. K. V. Kalko, I. Cottontail, N. Wellinghausen y V. M. Cottontail (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 rRNA gene for lineage identification. *Infection Genetics and Evolution* 12, 1328–1332.
- Rademaker, V., H. M. Herrera, T. R. Raffel, P. S. D’Andrea, T. P. T. Freitas. U. G. P. Abreu, P. J. Hudson y A. M. Jansen (2009). What is the role of small rodents in the transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma*

*evansi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae)? A study case in the Brazilian Pantanal. *Acta Tropica* 111:102-107.

Ramírez, J. D., G. Tapia-Calle, G. Muñoz-Cruz, C. Poveda, L. M. Rendón, E. Hincapié, y F. Guhlet (2013). Trypanosome species in neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infection Genetics and Evolution*.

Ramsey, J. M., A. E. Gutiérrez-Cabrera, L. Salgado-Ramirez, A. Townsend-Peterson, V. Sánchez-Cordero y C. N. Ibarra-Cerdeña (2012). Ecological Connectivity of *Trypanosoma cruzi* Reservoirs and *Triatoma pallidipennis* Hosts in an Anthropogenic Landscape with Endemic Chagas Disease. *PLOS ONE* 1-11.

Ramsey, J. M., R. Ordoñez, A. Cruz-Celis, A. L. Alvear, V. Chavez, R. Lopez, J. R. Pintor, F. Gamma y S. Carrillo (2000). Distribution of domestic triatominae and stratification of Chagas disease transmission in Oaxaca, Mexico. *Medical and veterinary entomology* 14:19-30.

Ramsey, J. M., R. Ordoñez, A. Tello-Lopez, J. L. Pohls, V. Sanchez y A. T. Peterson (2003). Actualidades sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Iniciativa para la vigilancia y el control de la enfermedad de Chagas* 85-103.

Rocha, L. F., A. L. R. Roque, J. S. Lima, C. C. Cheida, F. G. Lemos, F. C. Acevedo, R. C. Arrais, D. Bilac, H. M. Herrera, G. Moura y A. M. Jansen (2013). *Trypanosoma cruzi* Infection in Neotropical Wild Carnivores (Mammalia: Carnivora): At the Top of the *T. cruzi* Transmission Chain. *PLoS ONE* 8(7):e67463.

Rodríguez, L. y J. Palmeirim (1994). An infrared video system to count and identify emerging bats. *Bat Research News* 35:77-79.

- Roque, A. L. R., C. C. Samanta, X. M. Gerhardt, M. F. O. Silva, V. S. Lima, P. S. D'Andrea y A. M. Jansen (2013). *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission área Veterinary Parasitology 193:71–77.
- Rozas, J. (2009). DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. 337-350pp. In Posada, D. (ed.) Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods. *In Molecular Biology Series* Vol. 537. Humana Press, New Jersey, E.E.U.U.
- Solano, V. A. (2003). Diversidad de murciélagos cavernícolas de la depresión central del estado de Chiapas. (Tesis de Licenciatura) en Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa México D. F.
- Statsoft (2011). Statistica Trial Versión 10. Copyright© StatSoft. Inc. 1984-2011. <<http://www.statsoft.com>>.
- Stevens, L., M. C. Monroy, A. G. Rodas, P. L. Dorn (2014). Hunting, Swimming, and Worshipping: Human Cultural Practices Illuminate the Blood Meal Sources of Cave Dwelling Chagas Vectors (*Triatoma dimidiata*) in Guatemala and Belize. Plos Negative Tropical Disease. 8(9):e3047.
- Storino R., S. Augerb, O. Caravellob, M. I. Urrutiaa, M. Sanmartino, M. Jörg (2002). Cardiopatía chagásica en pacientes de área endémica versus contagiados en forma ocasional. Revista de Salud Pública 36:755-758.
- Sturm, N. R, W. Degrave, C. Morel y L. Simpson (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. Molecular and Biochemical Parasitology 33: 205–214.

- Téllez-Girón, G. (2005). *Artibeus hirsutus*, en Los mamíferos silvestres de México. Ceballos, G. y Oliva, G. (eds). Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 988pp.
- Thomas, M. E., J. J. Rasweiler Y A. D'Alessandro (2007). Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive Neotropical bats. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 102(5):559-565.
- Villegas-García, J. C. y S. Santillán-Alarcón (2001). Sylvatic focus of American Trypanosomiasis in the State of Morelos, México. *Revista de biología tropical* 49:1-5.
- Villegas-García, J. C. y S. Santillán-Alarcón (2004). American trypanosomiasis in central Mexico: *Trypanosoma cruzi* infection in triatomine bugs and mammals from the municipality of Jiutepec in the state of Morelos. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 98:529-532.
- Woo, P. C., S. K. Lau, Y. Huang y K. Y. Yuen (2009). Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Experimental Biology and Medicine*. 121:190-193.
- Yeo M., N. Acosta, M. Llewellyn, H. Sánchez, S. Adamson, G. A. Miles, E. López, N. González, J. S. Patterson, M. W. Gaunt, A. R. De Arias, M. A. Miles (2005). Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International Journal for Parasitology* 35:225–233.
- Zavala, J. T., J. T. S. Vega, L. C. Romero, R. R. Cabello, D. R. Sánchez. y J. A. G. Tay (2008). Estudios del ciclo biológico de *Triatoma pallidipennis* (Stat 1872) y otros aspectos sobre su biología. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM* 51(2)56-59.