

Infeción con *Toxoplasma gondii* (Eucoccidiorida: Sarcocystidae) en murciélagos de Campeche y Yucatán, México

Marco Torres-Castro¹, Diana Muñoz-Dueñas¹, Silvia Hernández-Betancourt², Manuel Bolio-González³, Henry Noh-Pech¹, Ronald Peláez-Sánchez⁴ & Javier Sosa-Escalante⁵

1. Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes, Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán. Avenida Itzáes x 59, No. 490, Centro, C.P. 97000, Mérida, Yucatán, México; antonio.torres@correo.uady.mx, dianamunoz92@hotmail.com, henry.noh@correo.uady.mx
2. Departamento de Bioecología Animal, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Km. 15.5 carretera Mérida-X’matkuil, C.P. 97100, Mérida, Yucatán, México; hbetanc@correo.uady.mx
3. Cuerpo Académico de Salud Animal, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Km. 15.5 carretera Mérida-X’matkuil, C.P. 97100, Mérida, Yucatán, México; bgonz@correo.uady.mx
4. Grupo de Investigación en Ciencias Básicas, Escuela de Graduados, Universidad CES, Calle 10 A No. 22-04, Medellín, Antioquia, Colombia; rpelaezp@ces.edu.co
5. Laboratorio DIMyGEN, Calle 78 No. 578, Residencial Pensiones VI, C.P. 97217, Mérida, Yucatán, México; javiersosae@hotmail.com

Recibido 12-XI-2018. Corregido 17-I-2019. Aceptado 07-V-2019.

Abstract: Infection with *Toxoplasma gondii* (Eucoccidiorida: Sarcocystidae) in bats of Campeche and Yucatán, Mexico. *Toxoplasma gondii* is a protozoan parasite recognized as the causative agent of toxoplasmosis, a zoonotic disease that affects humans and domestic or wild animals. In Mexico, it represents a public and animal health problem, especially in regions with tropical and subtropical climates. Bats have been reported as accidental hosts in the transmission cycle; however, there is no preceding information in Mexico. Therefore, the aim of the present study is to report the *T. gondii* infection in bats captured in sites of Campeche and Yucatan states, Mexico. Bats were captured in two sites in Yucatan (X’matkuil and Panaba) and one in Campeche (Hampolol), located in the Yucatan Peninsula. Kidneys, spleen, and liver were collected and used in the total DNA extraction. *Toxoplasma gondii* infection was detected through the amplification of a B1 gene fragment, using nested PCR. The positive PCR products were purified and sent to sequencing for a posterior sequence identity analysis. Additionally, a phylogenetic tree was made. A total of 69 bats belonging to eight different species were processed: 41 (59.4 %, 41/69) *Artibeus jamaicensis*; six (8.7 %, 6/69) *Pteronotus parnellii*; six (8.7 %, 6/69) *Noctilio leporinus*; six (8.7 %, 6/69) *Chiroderma villosum*; four (5.8 %, 4/69) *Glossophaga soricina*; two (2.9 %, 2/69) *Carollia sowelli*; two (2.89 %, 2/69) *Artibeus lituratus*; and two (2.9 %, 2/69) *Rhogeessa aeneus*. The nested PCR identified eight (11.6 %, 8/69) infected bats: six (75 %, 6/8) *A. jamaicensis*, captured in X’matkuil and Panaba, one (12.5 %, 1/8) *G. soricina*, and one (12.5 %, 1/8) *C. villosum*, both captured in Panaba. The alignment analysis yielded 99-100 % for cover and 97-99 % for identity to *T. gondii* sequences. Our results contribute to the understanding of the *T. gondii* transmission cycle in the region; however, future research is needed to determine circulating genotypes, as previous studies have demonstrated that these animals might be infected with identified genotypes in other domestic or wild animals and even in humans.

Key words: transmission cycle; *Toxoplasma gondii*; Chiroptera; infection; B1; nested PCR.

Torres-Castro, M., Muñoz-Dueñas, D., Hernández-Betancourt, S., Bolio-González, M., Noh-Pech, H., Peláez-Sánchez, R., & Sosa-Escalante, J. (2019). Infeción con *Toxoplasma gondii* (Eucoccidiorida: Sarcocystidae) en murciélagos de Campeche y Yucatán, México. *Revista de Biología Tropical*, 67(3), 633-642.

Toxoplasma gondii (phylum Apicomplexa) es un protozooario parásito con distribución mundial, capaz de infectar aves, animales mamíferos (terrestres o marinos) y al ser humano. De todos ellos, los felinos domésticos o silvestres son los hospederos finales o definitivos, por lo que su participación en el ciclo de transmisión es fundamental (Dubey & Jones, 2008). La infección en seres humanos (conocida clínicamente como toxoplasmosis) es generalmente resultado de la ingestión accidental de carne mal cocida con quistes tisulares, o de alimentos o agua contaminados con ooquistes de *T. gondii*. Aunque también se transmite vía vertical o congénita (dependiendo de la semana de gestación) y por transfusiones sanguíneas contaminadas con el parásito (Elmore et al., 2010).

La seroprevalencia en seres humanos puede ser desde un 10 % en zonas templadas, hasta superar el 80 % en países en vías de desarrollo o en áreas tropicales; no obstante, la infección generalmente es asintomática, pero llega a complicarse en fetos afectados o en personas inmunocomprometidas o inmunosuprimidas (Kaplan et al., 2009). En México, la seroprevalencia reportada varía del 15 al 50 % (Galván-Ramírez, Troyo, Román, Calvillo-Sánchez, & Bernal-Redondo, 2012). Específicamente en la Península de Yucatán, la infección con *T. gondii* ha sido detectada en seres humanos y animales domésticos (Hernández-Cortazar et al., 2015) o silvestres (Torres-Castro et al., 2016a; 2016b; Torres-Castro, Medina-Pinto, Noh-Pech, Puerto, & Rodríguez-Vivas, 2019), lo cual indica una alta contaminación ambiental con ooquistes que sobreviven por las condiciones medioambientales favorables (Hernández-Cortazar et al., 2015).

Los murciélagos (orden Chiroptera) son los únicos mamíferos con capacidad de vuelo y representan a uno de los taxones más numerosos y diversos (superados por los roedores) con aproximadamente 1 386 especies reconocidas a nivel mundial (Burgin, Colella, Kahn, & Upham, 2018), de las cuales 138 (alrededor del 10 % de la diversidad total) han sido identificadas en México (Ceballos & Arroyo-Cabral, 2012) y 62 en la Península de Yucatán

(MacSwiney, Vilchis, Clarke, & Racey, 2007). Estos animales tienen relevancia en los ciclos epidemiológicos de varios agentes etiológicos, ya que algunas especies son reservorios naturales u hospederos accidentales, convirtiéndolos en probables fuentes de infección para seres humanos y animales domésticos o silvestres (Calisher, Childs, Field, Holmes, & Schountz, 2006). Sin embargo, muchos aspectos sobre su participación en el ciclo de transmisión de *T. gondii* son desconocidos (Cabral et al., 2013).

Por otra parte, en murciélagos australianos cautivos de las especies *Pteropus conspicillatus* (conocido como zorro volador) y *P. scapulatus* (conocido como zorro volador rojo), la infección con *T. gondii*, detectada por inmunohistoquímica en pulmones y cerebro, ocasionó enfermedad clínica caracterizada por fallas orgánicas y signos nerviosos severos. No obstante, no fue posible determinar el tiempo de evolución y tampoco la fuente de contagio (Sangster, Gordon, & Hayes, 2012).

Mundialmente existen algunas investigaciones (serológicas y moleculares) que han evidenciado la infección con *T. gondii* en murciélagos de distintas especies y hábitos alimenticios (Cabral et al., 2013; Yuan et al., 2013; Dodd et al., 2014; Biazus et al., 2016). En México y otros países de Centro y Norteamérica, no existe información sobre su inclusión en el ciclo de transmisión de *T. gondii*, por lo que el objetivo del presente estudio es reportar la infección con *T. gondii* en murciélagos capturados en sitios de Campeche y Yucatán, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de estudio: La captura de murciélagos se llevó a cabo en dos sitios del estado de Yucatán y uno del estado de Campeche, todos localizados en la Península de Yucatán, México. La primera captura se realizó en el centro ecoturístico 'Ich ha lol xaan', Hampolol, Campeche (19°55'36.944" - 19°56'36.2" N & 90°23'15.979" - 90°22'29.6" W), cuya vegetación predominante es la selva mediana subperennifolia y el clima cálido subhúmedo

con lluvias en verano (Aw0) con temperatura media de 25.6 °C y precipitación pluvial media de 81.3 mm. Tiene una altitud media de 10 m (Gutiérrez-Báez, Zamora-Crescencio, & Puc-Garrido, 2013).

Las capturas en Yucatán se realizaron en: 1) San Francisco, Panabá (21°17'49.466" - 21°21'48.2" N & 88°16'12.437" - 88°19'23.6" W), cuya vegetación característica es la selva baja caducifolia con áreas de pastizal y el clima es Aw0 con temperatura media de 27 °C y precipitación pluvial de 1 094 mm. Tiene una altitud media de 17 m (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, 2018); 2) X'matkuil, Mérida (20°51'41.04" N & 89°37'27.84" W), la cual se encuentra dentro de la reserva ecológica "Cuxtal" y cuya vegetación original era la selva baja caducifolia, pero que actualmente el suelo está ocupado por asentamientos humanos y en menor grado por explotaciones agropecuarias (Ucan-Euan, Hernández-Betancourt, Arjona-Torres, Pantimay, & Torres-Castro, 2019). El clima predominante en la región es Aw0 con temperatura media de 26 °C y precipitación pluvial de hasta 1 100 mm. Tiene una altitud media de 10 m (INAFED, 2018).

Captura y recolección de muestras biológicas: Las capturas se realizaron en mayo (Hampolol), agosto (Panabá) y septiembre (X'matkuil) de 2017. La recolección fue aprobada por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) (registro de acta: CB-CCBA-I-2018-001) y de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) de México (registros de actas: SGPA/DGVS/03705/17 y SGPA/DGVS/01186/17).

Cada sitio de estudio se muestreó hasta por tres noches, según la actividad de los murciélagos y las condiciones climáticas. Se colocaron de 18:30 - 23:00 h, tres redes de niebla (12 de largo x 2.6 m de alto) en puntos previamente seleccionados cercanos a cuerpos de agua, posibles zonas de descanso y/o tránsito para alimentación. Las revisiones de las redes

fueron en intervalos de hasta 20 min. Todos los murciélagos se retiraron con guantes de carnaza y se colocaron en bolsas de tela con jareta, identificadas con el número de red y la hora de captura; posteriormente se trasladaron a laboratorios temporales para su procesamiento.

Los murciélagos fueron anestesiados e insensibilizados con isoflurano y sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico vía intracardiaca, siguiendo las especificaciones de la *American Veterinary Medical Association* (AVMA, 2013). Las especies se identificaron con ayuda de claves taxonómicas (Medellín, Arita, & Sánchez, 2008; Reid, 2009).

Durante la anestesia se registraron las medidas somáticas convencionales, peso, sexo y edad (machos: adultos con testículos escrotados se consideraron activos y jóvenes con testículos inguinales se consideraron inactivos. Hembras: adultas gestantes, lactantes o con el orificio vaginal abierto, se consideraron activas y jóvenes con el orificio vaginal cerrado se consideraron inactivas).

Se realizó una necropsia para la recolección de muestras biológicas de bazo, hígado y riñón, las cuales fueron depositadas en viales para microcentrifuga de 1.5 ml (Eppendorf®, Hamburgo, Alemania) y conservadas a -4 °C hasta su traslado al Laboratorio de Enfermedades Emergentes y Reemergentes (LEER) del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" (CIR) - UADY, en donde se almacenaron a -70 °C para su posterior empleo en la extracción de ADN total. Los cadáveres de todos los animales capturados se procesaron y depositaron en las colecciones zoológicas de la FMVZ-UADY y de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), sede San Cristóbal de las Casas, Chiapas.

Extracción de ADN total y diagnóstico molecular de *Toxoplasma gondii*: El ADN total se extrajo por medio del estuche comercial *NucleoSpin® Tissue* (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Alemania), previa digestión con proteínasa K (OMEGA Bio-tek, Georgia, Estados Unidos), siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

Desafortunadamente, por cuestiones ajenas a la presente investigación (objetivos de otros estudios), no fue posible emplear los tres órganos de cada uno de los murciélagos capturados.

Posteriormente, empleando un espectrofotómetro (NanoDrop 2000™, Thermo Scientific®, Wilmington, Estados Unidos) se cuantificó y se verificó la presencia de contaminantes o inhibidores en los aminoácidos extraídos y se conservaron a -20 °C para su uso en el diagnóstico molecular de *T. gondii*.

La infección con *T. gondii* se determinó a través de PCR anidada. En la primera reacción se utilizaron los cebadores descritos por Sroka, Szymańska & Wójcik-Fatla (2009): ml/S1 (5'-TGTTCTGTCCTATCGCAACG-3') y Pml/AS1 (5'-ACGGATGCAGTTCTTTCTG-3') y en la segunda Pml/S2 (5'-TCTTCCCA-GACGTGGATTTC-3') y Pml/AS2 (5'-CTC-GACAATACGCTGCTTGA-3'). Ambas reacciones amplifican un segmento del gen B1 de *T. gondii* con un tamaño final de 560 pares de bases (pb).

Los reactivos en ambas reacciones tuvieron las siguientes concentraciones en un volumen final de 25 µl: PerfeCTa SYBR® Green FastMix® 1X (Quantabio®, Massachusetts, Estados Unidos), 0.1 µM de cada oligonucleótido correspondientes a la primera o segunda reacción y 3 µl de ADN templado. Asimismo, las condiciones en el termociclador fueron: un ciclo de tres minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 64.2 °C y 45 s a 72 °C, finalmente un ciclo de cinco min a 72 °C.

La electroforesis de los productos de PCR se efectuó en geles de agarosa al 1 %, teñidos con bromuro de etidio. La visualización se hizo en un fotodocumentador (Bio-Rad®, California, Estados Unidos).

Purificación, secuenciación, análisis de secuenciación y construcción del árbol filogenético: Ocho productos positivos fueron purificados con el estuche comercial Zymo-clean™ *Gel DNA Recovery* (Zymo Research, California, Estados Unidos) y enviados para secuenciación al laboratorio DIMYGEN (<http://www.dimygen.com>; Mérida, México).

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con el programa MEGA versión 7.0® (<https://www.megasoftware.net/>) y comparadas con otras secuencias previamente depositadas en el GenBank®, utilizando el algoritmo Megablast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

La construcción del árbol filogenético se realizó utilizando el método de inferencia evolutiva *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987) con mil réplicas según el método bootstrap (Felsenstein, 1985). Las distancias evolutivas se calcularon empleando el modelo de 2-parámetros de Kimura (Kimura, 1980). El análisis evolutivo se realizó en el programa MEGA versión 7.0® (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016).

RESULTADOS

Se capturaron un total de 69 murciélagos en las tres localidades de estudio, pertenecientes a ocho especies distintas: 41 (59.4 %, 41/69) *Artibeus jamaicensis*; seis (8.7 %, 6/69) *Pteronotus parnellii*; seis (8.7 %, 6/69) *Noctilio leporinus*; seis (8.7 %, 6/69) *Chiroderma villosum*; cuatro (5.8 %, 4/69) *Glossophaga soricina*; dos (2.9 %, 2/69) *Carollia sowelli*, dos (2.89 %, 2/69) *Artibeus lituratus* y dos (2.9 %, 2/69) *Rhogeessa aeneus*. Hampolol, Campeche, registró la mayor riqueza y la mayor abundancia de individuos recolectados. La especie con mayor frecuencia de captura fue *Artibeus jamaicensis* (Tabla 1).

La PCR anidada identificó ocho (11.6 %, 8/69) murciélagos positivos a la infección con *T. gondii*, distribuidos de la siguiente manera: seis (75 %, 6/8) *A. jamaicensis* (cuatro de X³matkuil y dos de Panabá), un (12.5 %, 1/8) *G. soricina* y un (12.5 %, 1/8) *C. villosum* (ambos capturados en Panabá), por lo que en Hampolol, Campeche, no se capturaron animales positivos (Tabla 2). Ninguno de los murciélagos positivos presentó signos clínicos compatibles con la enfermedad (Sangster et al., 2012).

La infección con *T. gondii* se detectó en todos los órganos explorados: riñón (8.7 %, 6/69), hígado (4.6 %, 2/43) y bazo (9.1 %, 2/22).

TABLA 1

Especies y número total de los murciélagos capturados por sitio de estudio en los estados de Campeche y Yucatán, México

TABLE 1

Species and the total number of bats captured by study site in the states of Campeche and Yucatán, Mexico

Especies	Sitios			Total
	Yucatán		Campeche	
	Panabá	X'matkuil	Hampolol	
<i>Artibeus jamaicensis</i>	12	22	7	41
<i>Pteronotus parnellii</i>	0	0	6	6
<i>Noctilio leporinus</i>	0	0	6	6
<i>Chiroderma villosum</i>	5	0	1	6
<i>Glossophaga soricina</i>	3	0	1	4
<i>Carollia sowelli</i>	0	0	2	2
<i>Artibeus lituratus</i>	1	0	1	2
<i>Rhogeessa aeneus</i>	1	0	1	2
Total	22	22	25	69

TABLA 2

Número de individuos capturados y porcentaje de infección según las especies de murciélagos capturados en sitios de la Península de Yucatán, México

TABLE 2

Number of individuals captured and infection percentage according to the species of bats captured in sites of the Yucatán Peninsula, Mexico

Especie	Hábitos alimenticios	Número de individuos capturados	Número de individuos positivos (porcentaje de infección)
<i>Artibeus jamaicensis</i>	Frugívoro	41	6 (14.6 %)
<i>Pteronotus parnellii</i>	Insectívoro	6	0 (0 %)
<i>Noctilio leporinus</i>	Ictiófago/Insectívoro (ocasionalmente)	6	0 (0 %)
<i>Glossophaga soricina</i>	Nectarívoro/Frugívoro (ocasionalmente)	4	1 (25 %)
<i>Carollia sowelli</i>	Frugívoro	2	0 (0%)
<i>Chiroderma villosum</i>	Frugívoro/Nectarívoro o insectívoro (ocasionalmente)	6	1 (16.6 %)
<i>Artibeus lituratus</i>	Frugívoro	2	0 (0 %)
<i>Rhogeessa aeneus</i>	Frugívoro	2	0 (0 %)
Total		69	8 (11.6 %)

Dos *A. jamaicensis* (capturados en X'matkuil) fueron reactivos en riñón y bazo, cuatro individuos únicamente en riñón y dos en bazo.

El análisis bioinformático arrojó porcentajes de 99-100 % para cobertura y 97-99 % para identidad en comparación con secuencias previas de *T. gondii* (claves de acceso en GenBank KY514164.1 y MF576257.1). De igual forma, el árbol filogenético demostró que los aislados de los murciélagos obtenidos en nuestra

investigación son similares a secuencias del grupo (genotipo) tres (III) de *T. gondii* (Fig. 1).

DISCUSIÓN

A nivel mundial se conocen pocos aspectos sobre la infección con *T. gondii* en murciélagos (Cabral et al., 2013), por lo que nuestros resultados contribuyen al entendimiento del ciclo de transmisión del parásito en estos animales.

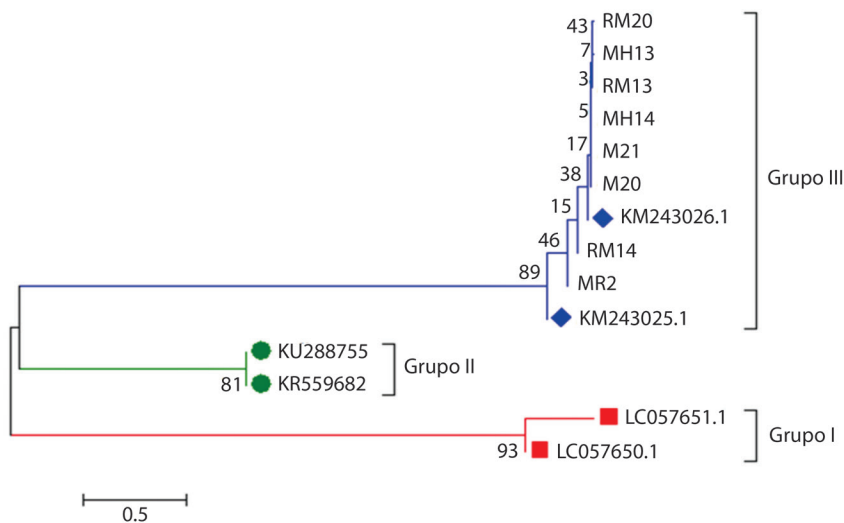


Fig. 1. Secuencias de los fragmentos del gen B1 de *T. gondii* obtenidas de los murciélagos capturados en sitios de Yucatán y Campeche, México.

Los aislados del presente estudio corresponden a los prefijos RM, MH y M, relacionadas con el genotipo (grupo) tres (III) de *T. gondii*. Las longitudes de rama están en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Se muestra el árbol óptimo con la suma de longitud de rama igual a 6.70649030. El análisis involucró un total de 14 secuencias de nucleótidos y 143 posiciones en el conjunto final de datos. Las secuencias de referencia en el grupo III (KM) fueron aisladas de *Mytilus californianus*. Las secuencias del grupo II (KU y KR) fueron aisladas de *Myrmecophaga tridactyla* y *Phalacrocorax carbo sinensis*, respectivamente. Las secuencias del grupo I (LC) fueron aisladas de seres humanos.

Fig. 1. Phylogenetic tree constructed with the sequences of the *T. gondii* B1 gene fragments, obtained from the captured bats in Yucatán and Campeche, Mexico.

The isolates of the present study correspond to the RM, MH, and M prefixes, related to the genotype (group) three (III) of *T. gondii*. The branch lengths are in the same units as the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The optimal tree is shown with the sum of the branch length equal to 6.70649030. The analysis involves a total of 14 nucleotide sequences and 143 positions in the final data set. The reference sequences in group III (KM) were isolated from *Mytilus californianus*. Group II sequences (KU and KR) were isolated from *Myrmecophaga tridactyla* and *Phalacrocorax carbo sinensis*, respectively. Group I (LC) sequences were isolated from humans.

Además, representan el primer registro en quirópteros capturados en países de Centro o Norteamérica.

Las frecuencias de infección con *T. gondii* en murciélagos alrededor del mundo son variadas. En Brasil, Cabral et al. (2013), reportaron una prevalencia de 0.05 % (2/369) obtenida a partir de PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*), también, de Jesus et al. (2017), describieron un 2 % (2/97) en murciélagos frugívoros capturados en el estado de Bahía, empleando la amplificación de un fragmento del gen B1 de *T. gondii*. En China, Qin et al. (2014) y Jiang et al.

(2014), determinaron un 6.1 % (38/626) y 9.7 % (59/608) de animales infectados capturados en cuatro provincias y en la región sureste, respectivamente; ambos estudios utilizaron el aislamiento de un fragmento del gen B1 por PCR anidada. Estos trabajos arrojaron frecuencias menores a la encontrada en la presente investigación (11.6 %, 8/69). No obstante, en la región nororiental de Brasil, Fournier et al. (2014), obtuvieron una prevalencia del 21.6 % (11/51), y en Birmania, Sun et al. (2013), determinaron un 29.3 % (161/550) en murciélagos de cinco especies distintas, por lo que ambos resultados son superiores al establecido por nosotros. Por

último, Dodd et al. (2014), mencionaron una tasa de infección (similar a la nuestra) del 10.39 % (8/77), obtenida a través de PCR anidada dirigida a una fracción del antígeno de superficie 1 de *T. gondii*, siendo hasta el momento el único reporte en el continente europeo.

Las variaciones entre las frecuencias de infección pueden deberse a los numerosos hábitos alimenticios (frugívoros, insectívoros, hematófagos, etc.) de los murciélagos (Sun et al., 2013). Existen varias hipótesis sobre cómo estos animales adquieren la infección. En el caso de los insectívoros, el contagio puede presentarse por el consumo de insectos descritos como vectores mecánicos de ooquistes de *T. gondii* (Chinchilla & Ruiz, 1976; Graczyk, Knight, & Tamang, 2005). Otra vía, la cual es común en animales mamíferos (independientemente del tipo de dieta), es el consumo de agua en fuentes naturales contaminada con ooquistes (Cabral et al., 2013), lo cual es argumentado por Dodd et al. (2014) en murciélagos frugívoros capturados en Reino Unido. Asimismo, la conducta de acicalamiento en algunas especies (especialmente hematófagos), tal vez provoca la ingesta involuntaria de ooquistes presentes en el pelaje, lo cual ocurre principalmente en hembras maduras (Sodré, da Gama, & Almeida, 2010). Otra hipótesis sobre la transmisión en murciélagos hematófagos es el consumo de taquizoítos en sangre de animales en la etapa aguda de la infección, aunque este mecanismo es poco probable debido al carácter crónico de *T. gondii* (Cabral et al., 2013).

Adicionalmente, la transmisión congénita de *T. gondii* en animales mamíferos (que es considerada extremadamente inusual), ha sido reportada en estudios hechos con mamíferos pequeños como roedores (Hide et al., 2009; Thomasson et al., 2011), por lo que también podría ocurrir en murciélagos e influir en las frecuencias de infección detectadas (Dodd et al., 2014); sin embargo, son necesarios trabajos futuros para esclarecer esta vía.

En el caso particular de los murciélagos ictiófagos como el *N. leporinos* (el cual no fue identificado como positivo en nuestro estudio), también pueden infectarse por el consumo de

peces con quistes tisulares de *T. gondii*, ya que algunos de ellos (en fuentes de agua dulce) han sido identificados como hospederos accidentales (Aakool & Abidali, 2016).

La distribución de quistes de *T. gondii* en murciélagos afectados es poco conocida; no obstante, se ha reportado tropismo en cerebro, músculo esquelético, corazón, pulmones, bazo e hígado (Sangster et al., 2012; Fournier et al., 2014), coincidiendo estos dos últimos con lo encontrado en nuestra investigación. Vale la pena mencionar que la infección en los murciélagos estudiados también se identificó en riñones, lo cual es similar a lo descrito en algunos roedores capturados en la región (Torres-Castro et al., 2016b) y otros animales silvestres (Torres-Castro et al., 2019). Es posible que la distribución de los ooquistes de *T. gondii* en los organismos de animales afectados esté asociada al genotipo involucrado en la infección (Sangster et al. 2012; Cabral et al., 2013).

El análisis filogenético correspondiente al fragmento del gen B1 de los aislados obtenidos en los murciélagos capturados, demostró que las secuencias finales resultaron similares al genotipo III de *T. gondii* (Fig. 1). Lo cual concuerda con lo reportado por Cabral et al. (2013) en murciélagos frugívoros e insectívoros de Brasil.

El hallazgo de murciélagos infectados con *T. gondii* resulta relevante debido a que, en ambientes silvestres, estos animales y otros mamíferos pequeños forman parte de la dieta habitual de felinos, lo cual ocurre esporádicamente con gatos domésticos, convirtiéndose en fuentes de infección y en posibles mecanismos de transmisión (Cañón-Franco, de Araújo, & Gennari, 2013; Yuan et al., 2013).

Son necesarias más investigaciones epidemiológicas para determinar otros genotipos de *T. gondii* circulantes en murciélagos de la región, ya que estudios anteriores han demostrado que pueden presentar genotipos aislados en otros animales (domésticos o silvestres) e incluso en seres humanos (Qin et al., 2014), lo cual influye en la dinámica de transmisión e infección entre las especies de murciélagos presentes (Jiang et al., 2014). Por otra parte,

también son necesarias evaluaciones ambientales para determinar el nivel de contaminación por ooquistes de *T. gondii* en las cavernas o sitios de reposo de los murciélagos capturados, ya que previamente ha sido señalado como factor influyente en la prevalencia de infección (Yuan et al., 2013).

Declaración de ética: los autores declaran que todos están de acuerdo con esta publicación y que han hecho aportes que justifican su autoría; que no hay conflicto de interés de ningún tipo; y que han cumplido con todos los requisitos y procedimientos éticos y legales pertinentes. Todas las fuentes de financiamiento se detallan plena y claramente en la sección de agradecimientos. El respectivo documento legal firmado se encuentra en los archivos de la revista.

AGRADECIMIENTOS

A Yessica Gurubel, Emir Palomo, Naomi Cuevas, Viviana Febles, Eréndira Estrella, Belén Herrera y Alonso Panti, por su apoyo en el trabajo de campo y el procesamiento de los murciélagos. A Bibiana Reyes, por su apoyo en el diagnóstico molecular. A la LEII. Irene Castillo Rivas, por la traducción del resumen al inglés. La captura de murciélagos y toma de muestras biológicas fue financiada por el proyecto 251053-CONACYT, México.

RESUMEN

Toxoplasma gondii es un protozooario parásito reconocido como el agente causal de la toxoplasmosis, enfermedad zoonótica que afecta a humanos y animales domésticos o silvestres. En México, representa un problema de salud pública y veterinaria, sobre todo en regiones con climas tropicales y subtropicales. Los murciélagos han sido identificados como hospederos accidentales en el ciclo de transmisión; no obstante, en México no existe información previa; por lo tanto, el objetivo del presente estudio es reportar la infección con *T. gondii* en murciélagos capturados en sitios de los estados de Campeche y Yucatán, México. Se capturaron murciélagos en dos sitios de Yucatán y uno de Campeche, ubicados en la Península de Yucatán. Se recolectaron riñones, bazo e hígado y se emplearon en la extracción de ADN total. La infección con *T. gondii* se

detectó a través de la amplificación de un fragmento del gen B1, utilizando PCR anidada. Los productos positivos fueron purificados y enviados a secuenciación para su posterior análisis de alineamiento; adicionalmente, se construyó un árbol filogenético. Se analizaron un total de 69 murciélagos pertenecientes a ocho especies distintas: 41 (59.4 %, 41/69) *Artibeus jamaicensis*; seis (8.7 %, 6/69) *Pteronotus parnellii*; seis (8.7 %, 6/69) *Noctilio leporinus*; seis (8.7 %, 6/69) *Chiroderma villosum*; cuatro (5.8 %, 4/69) *Glossophaga soricina*; dos (2.9 %, 2/69) *Carollia sowelli*; dos (2.89 %, 2/69) *Artibeus lituratus* y dos (2.9%, 2/69) *Rhogeessa aeneus*. La PCR anidada identificó ocho (11.6 %, 8/69) murciélagos positivos a la infección: seis (75 %, 6/8) *A. jamaicensis*, capturados en X'matkuil y Panabá, un (12.5 %, 1/8) *G. soricina* y un (12.5 %, 1/8) *C. villosum*, ambos capturados en Panabá. El análisis de alineamiento arrojó 99-100 % para cobertura y 97-99 % para identidad respecto a secuencias de *T. gondii*. Nuestros resultados aportan al entendimiento del ciclo de transmisión de *T. gondii* en la región; sin embargo, son necesarias investigaciones futuras para determinar los genotipos circulantes, ya que estudios anteriores han demostrado que estos animales pueden estar infectados con genotipos identificados en otros animales domésticos o silvestres e incluso en humanos.

Palabras clave: ciclo de transmisión; *Toxoplasma gondii*; quirópteros; infección; B1; PCR anidada.

REFERENCIAS

- Aakool, A. A. K., & Abidali, S. J. (2016). Molecular detection of *Toxoplasma gondii* in native freshwater fish *Cyprinus carpio* in Wasit Province Iraq. *International Journal of Scientific Engineering and Research*, 4(7), 7-10.
- American Veterinary Medical Association (AVMA). (2013). *AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition*. Recuperado de <https://www.avma.org/KB/Polices/Documents/euthanasia.pdf>
- Biazus, A. H., Dezen, D., de Barros, L. D., Garcia, J. L., Pires-Portella, L., Flores-Vogel, F., ... Schafer-da Silva, A. (2016). Antibodies against *Toxoplasma gondii* in bats (*Desmodus rotundus*) captured near caves in cities from western region of Santa Catarina State, Brazil. *Comparative Clinical Pathology*, 25(2), 505-507.
- Burgin, C. J., Colella, J. P., Kahn, P. L., & Upham, N. S. (2018). How many species of mammals are there? *Journal of Mammalogy*, 99(1), 1-14.
- Cabral, A. D., Gama, A. R., Sodré, M. M., Savani, E. S., Galvão-Dias, M. A., Jordão, L. R., ... Pena, H. F. (2013). First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from bats (Mammalia: Chiroptera). *Veterinary Parasitology*, 193(1-3), 100-104.

- Calisher, C., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K. V., & Schountz, T. (2006). Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 531-545.
- Cañón-Franco, W. A., de Araújo, F. A. P., & Gennari, S. M. (2013). *Toxoplasma gondii* in small neotropical wild felids. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 50(1), 50-67.
- Ceballos, G., & Arroyo-Cabrales, J. (2012). Lista actualizada de los mamíferos de México 2012. *Revista Mexicana de Mastozoología Nueva Época*, 2(1), 27-80.
- Chinchilla, M., & Ruiz, A. (1976). Cockroaches as possible transport hosts of *Toxoplasma gondii* in Costa Rica. *Journal of Parasitology*, 62(1), 140-142.
- de Jesus, R. F., Rodrigues, G. M., Silva, E. M., Carneiro, A. J., Franke, C. R., de Magalhães-Cunha, R., & Gondim, L. F. (2017). Toxoplasmatinae parasites in bats from Bahia State, Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*, 53(1), 144-147.
- Dodd, N. S., Lord, J. S., Jehle, R., Parker, S., Parker, F., Brooks, D. R., & Hide, G. (2014). *Toxoplasma gondii*: prevalence in species and genotypes of British bats (*Pipistrellus pipistrellus* and *P. pygmaeus*). *Experimental Parasitology*, 139, 6-11.
- Dubey, J. P., & Jones, J. L. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1257-1278.
- Elmore, S. A., Jones, J. L., Conrad, P. A., Patton, S., Lindsay, D. S., & Dubey, J. P. (2010). *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology*, 26(4), 190-196.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Fournier, G. F. D. R., Lopes, M. G., Marcili, A., Ramirez, D. G., Acosta, I. C. L., Ferreira, J. I. G. D., ... Gennari, S. M. (2014). *Toxoplasma gondii* in domestic and wild animals from forest fragments of the municipality of Natal, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(4), 501-508.
- Galván-Ramírez, M. de L., Troyo, R., Román, S., Calvillo-Sánchez, C., & Bernal-Redondo, R. (2012). A systematic review and meta-analysis of *Toxoplasma gondii* infection among the Mexican population. *Parasites & Vectors*, 5, 271.
- Graczyk, T. K., Knight, R., & Tamang, L. (2005). Mechanical transmission of human protozoan parasites by insects. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(1), 128-132.
- Gutiérrez-Báez, C., Zamora-Crescencio, P., & Puc-Garrido, E. (2013). Estructura y composición florística de la selva mediana subperennifolia de Hampolol, Campeche, México. *Foresta Veracruzana*, 15(1), 1-8.
- Hernández-Cortazar, I., Acosta-Viana, K. Y., Ortega-Pacheco, A., Guzmán-Marín, E. del S., Aguilar-Caballero, A. J., & Jiménez-Coello, M. (2015). Toxoplasmosis in Mexico: epidemiological situation in humans and animals. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(2), 93-103.
- Hide, G., Morley, E. K., Hughes, J. M., Gerwash, O., Elmahaishi, M. S., Elmahaishi, K. H., ... Smith, J. E. (2009). Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, 136(14), 1877-1885.
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED). (2018). *Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Estado de Yucatán*. Recuperado de <http://www.inafed.gob.mx>
- Jiang, H. H., Qin, S. Y., Wang, W., He, B., Hu, T. S., Wu, J. M., ... Zhu, X. Q. (2014). Prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* infection in bats in southern China. *Veterinary Parasitology*, 203(3-4), 318-321.
- Kaplan, J. E., Benson, C., Holmes, K. H., Brooks, J. T., Pau, A., Masur, H., ... HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. (2009). Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recommendations and Reports*, 58(RR-4), 1-207.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111-20.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- MacSwiney, G. M. C., Vilchis, P., Clarke, F. M., & Racey, P. A. (2007). The importance of cenotes in conserving bat assemblages in the Yucatan, Mexico. *Biological Conservation*, 136(4), 499-509.
- Medellín, R., Arita, H., & Sánchez, O. (2008). *Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo* (2a edición). México. D.F., México: Instituto de Ecología, Universidad Autónoma de Yucatán, Asociación Mexicana de Mastozoología.
- Qin, S. Y., Cong, W., Liu, Y., Li, N., Wang, Z. D., Zhang, F. K., ... Liu, Q. (2014). Molecular detection and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* infection in bats in four provinces of China. *Parasites & Vectors*, 7, 558.

- Reid, F. (2009). *A field guide to the mammals of America Central and Southeast México* (2n edition). New York, Unites States: Oxford University Press.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-25.
- Sangster, C. R., Gordon, A. N., & Hayes, D. (2012). Systemic toxoplasmosis in captive flying-foxes. *Australian Veterinary Journal*, 90(4), 140-142.
- Sodré, M. M., da Gama, A. R., & de Almeida, M. F. (2010). Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 52(2), 75-81.
- Sroka, J., Szymanska, J., & Wojcik-Fatla, A. (2009). The occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from east Poland with the use of pcr. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 16(2), 313-319.
- Sun, H., Wang, Y., Zhang, Y., Ge, W., Zhang, F., He, B., ... Llu, Q. (2013). Prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in bats in Myanmar. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(11), 3526-3528.
- Thomasson, D., Wright, E. A., Hughes, J. M., Dodd, N. S., Cox, A. P., Boyce, K., ... Hide, G. (2011). Prevalence and co-infection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in *Apodemus sylvaticus* in an area relatively free of cats. *Parasitology*, 138(9), 1117-1123.
- Torres-Castro, M., Noh-Pech, H., Puerto-Hernández, R., Reyes-Hernández, B., Panti-May, A., Hernández-Betancourt, S., ... Puerto, F. I. (2016a). First molecular evidence of *Toxoplasma gondii* in opossums (*Didelphis virginiana*) from Yucatan, Mexico. *Open Veterinary Journal*, 6(1), 57-61.
- Torres-Castro, M. A., Medina-Espinosa, D. N., Panti-May, J. A., Hernández-Betancourt, S. F., Noh-Pech, H. R., Yeh-Gorocica, A. B., ... Puerto, F. I. (2016b). First molecular evidence of *Toxoplasma gondii* in synanthropic rodents (*Mus musculus* and *Rattus rattus*) captured in Yucatan, Mexico. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 167(9-10), 250-255.
- Torres-Castro, M. A., Medina-Pinto, R. A., Noh-Pech, H. R., Puerto, F. I., & Rodríguez-Vivas, R. I. (2019). Molecular identification of *Toxoplasma gondii* in roadkill wild animals in Yucatan, Mexico. *Veterinaria México OA*, 6(1).
- Ucan-Euan, F., Hernández-Betancourt, S., Arjona-Torres, M., Panti-May, A., & Torres-Castro, M. (2019). Estudio histopatológico en tejido cardiaco de roedores infectados con *Trypanosoma cruzi*, capturados en barrios suburbanos, Mérida, México. *Biomédica*, 39(Sp. 2), Publicación anticipada.
- Yuan, Z. G., Luo, S. J., Dubey, J. P., Zhou, D. H., Zhu, Y. P., He, Y. ... Zhu, X. Q. (2013). Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in five species of bats in China. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 13(6), 422-424".