

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE TRI- PANOSOMAS AISLADOS DE QUIRÓPTEROS EN EL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA UTILIZANDO LA SSU ADN_r, ITS1 Y CATL

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF TRYPANOSOMES ISOLATED FROM CHIROPTERA IN THE TOLIMA DEPARTMENT, USING SSU rDNA, ITS1 AND CATL

Javier Andrés Trejo Varón¹, Paola Andrea Ortiz Vargas², Luciana Lima²,
Gustavo Adolfo Vallejo¹, Marta Maria Geraldtes Teixeira², Julio Cesar Carranza Martínez¹.

¹ Laboratorio de investigaciones en Parasitología Tropical (LIPT). Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima.
Jatrejovaron@gmail.com, gvallejo@ut.edu.co, jcarranza@ut.edu.co.

² Laboratorio de filogenia, taxonomía y diagnóstico molecular de tripanosomátidos. Instituto de ciencias Biomédicas.
Universidad de São Paulo. paolaortiz27@gmail.com, lulima79@gmail.com, mmgteix@icb.usp.br.

Recibido: Agosto 31 de 2013

Aceptado: Octubre 3 de 2013

*Correspondencia del autor. Laboratorio de investigaciones en Parasitología Tropical (LIPT).
Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima. Colombia.

Contacto: jcarranza@ut.edu.co.

RESUMEN

Reportes recientes registran el aislamiento de nuevas especies y genotipos de tripanosomas en quirópteros de América Latina. Para contribuir al conocimiento de los tripanosomas que circulan en los quirópteros de diferentes municipios del departamento del Tolima, se utilizaron las técnicas moleculares basadas en PCR específico y secuenciamiento de ADN de las regiones V7-V8 de la SSU ADN_r, ITS1 del cistron ribosomal y CATL para determinar las especies, los genotipos circulantes y su filogenia. Los quirópteros fueron capturados utilizando redes de niebla. Cada individuo fue determinado por taxonomía tradicional, posteriormente fueron sedados para tomar una muestra de sangre que se sembró en medio de cultivo bifásico (NNN-LIT) y posteriormente el animal fue liberado. Una alícuota de sangre fue almacenada en etanol al 70% para la obtención de ADN y efectuar la determinación molecular de los quirópteros muestreados. Los medios de cultivo fueron examinados microscópicamente cada semana para verificar la presencia de flagelados. Los aislados positivos fueron sometidos al procedimiento de extracción de ADN por el método FCAI y posteriormente fueron aplicadas las técnicas moleculares. Los resultados de la caracterización molecular mostraron la presencia de 3 especies de tripanosomas: *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi marinkellei* y *T. rangeli* en 4 especies de quirópteros: *Phyllostomus discolor*, *P. hastatus*, *Artibeus lituratus* y *Carolia perspicilata*. De igual manera, los análisis filogenéticos permitieron realizar inferencias acerca de la ubicación filogenética de los aislados respecto a las cepas control.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma cruzi marinkellei*, *Trypanosoma rangeli*, *Chiroptera*, *SSU ADN_r*, *ITS1*, *CATL*.

ABSTRACT

Recent reports have reported the isolation of new trypanosome species and genotypes from Latin-American chiroptera. Molecular techniques involving specific PCR and DNA sequencing of small subunit (SSU) rDNA V7-V8 regions, ribosomal cistron internal transcribed spacer region 1 (ITS-1) and cathepsin L (CatL) were used for determining the species, circulating genotypes and their phylogeny to contribute towards knowledge regarding the trypanosomes circulating in chiroptera found in municipalities in the Tolima department. The chiroptera were captured using mist nets. Each bat was determined by traditional taxonomy. They were then sedated so that a blood sample could be taken; the animal was then released and the sample was cultured in biphasic medium (NNN-LIT). An aliquot of blood was stored in 70% ethanol for obtaining DNA and the molecular determination of the chiroptera being sampled. Culture medium was examined weekly by microscope to verify flagellate presence; DNA was then extracted from positive isolates using the phenol-chloroform isoamyl alcohol (PCI) method and the molecular techniques were then used. The molecular characterisation results revealed the presence of 3 trypanosome species: *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi marinkellei* and *T. rangeli* in 4 chiroptera species: *Phyllostomus discolor*, *P. hastatus*, *Artibeus lituratus* and *Carollia perspicillata*. Likewise, phylogenetic analysis led to inferences being drawn concerning the isolates' phylogenetic location regarding that of the control strains.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma cruzi marinkellei*, *Trypanosoma rangeli*, Chiroptera, SSU ADNr, ITS1, CATL.

INTRODUCCIÓN

El orden quiróptera es el segundo orden más abundante de mamíferos, representando aproximadamente una cuarta parte del total de mamíferos conocidos (1). La distribución de los quirópteros se encuentra asociada prácticamente a todas las regiones habitables de la tierra, concentrándose mayoritariamente en los trópicos (2). Dentro de su ciclo de vida, los quirópteros pueden ser huéspedes de diferentes agentes patógenos como el causante del síndrome respiratorio agudo severo, rabia, henipavirus, ebola y tripanosomas de importancia médica como *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* (3-7).

Por su parte, los tripanosomas son un grupo de parásitos protozoos compuesto por diferentes especies que son capaces de infectar diversos vertebrados, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (8). Hasta la fecha han sido reportadas cerca de 25 especies de tripanosomas capaces de infectar quirópteros alrededor del mundo, dentro de las cuales han sido reportadas 8 de ellas infectando quirópteros en Colombia (9-11). Dentro de las especies reportadas para nuestro país se destaca *Trypanosoma cruzi*, debido a su importancia en salud pública como agente etiológico de la enfermedad de Chagas, la cual es considerada como una enfermedad compleja debido a las grandes variaciones a nivel biológico, bioquímico y genético de su agente etiológico, hecho que se manifiesta en las DTU's que lo componen (12).

Durante los últimos años se han efectuado reportes de quirópteros infectados con nuevas especies y/o linajes

de tripanosomas (11, 13-16), así como especies y linajes conocidos con anterioridad.

En el presente trabajo nos propusimos aislar, caracterizar y analizar filogenéticamente los tripanosomas que circulan en la fauna quiróptera de diferentes municipios del departamento del Tolima utilizando tres marcadores moleculares nucleares, los cuales permitieron ubicar taxonómicamente estos tripanosomas e inferir diferencias de estos respecto a las cepas de referencia para cada uno de los casos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La captura de quirópteros se realizó en los municipios de Chaparral, Ortega, San Luis-Payande e Ibagué, en el departamento del Tolima (figura 1), utilizando redes de niebla. Cada espécimen colectado fue sedado e individualizado, para posteriormente realizar la toma de muestra de sangre, la cual fue utilizada con dos propósitos, el primero, realizar un hemocultivo en medio bifásico (LIT: Liver Infusion Tryptose / NNN: Novi, Nicolle, McNeal) (17, 18), el cual permitió el aislamiento de los hemoparásitos y segundo, conservar una alícuota de sangre en etanol al 70% para obtención de ADN, amplificación por PCR, secuenciación y comparación de las secuencias obtenidas para apoyar la determinación taxonómica de los quirópteros, comparando los datos de taxonomía tradicional y taxonomía molecular.

Los hemocultivos fueron incubados a 28°C y observados semanalmente al microscopio hasta evidenciar



Figura 1. Localización geográfica de los municipios muestreados en el Tolima. Fuente: <http://www.tolima.gov.co>

la presencia de tripanosomas; manteniendo aquellos hemocultivos positivos mediante repiques semanales en medio bifásico. Posteriormente, los cultivos fueron transferidos a medio líquido LIT, masificados, lavados, digeridos con proteinasa k y sometidos a proceso de extracción de ADN por el método Fenol Cloroformo Alcohol Isoamílico 25:24:1 (19) con algunas modificaciones.

La extracción de ADN para las muestras sanguíneas provenientes de los quirópteros colectados se realizó mediante el protocolo de extracción de ADN para tejidos animales (20).

Las muestras de ADN obtenidas de *Trypanosoma sp.* fueron cuantificadas mediante espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop 2000 y utilizadas para amplificar mediante PCR específico las regiones V7-V8 de la SSU ADN_r utilizando los iniciadores 609F y 706R (21); El espaciador Transcrito Interno 1 (ITS1) del clon de ADN_r, utilizando los iniciadores IR1 y 5,8R (22); y el gen CATL utilizando los iniciadores DTO154 y DTO155 (23). Se utilizaron los perfiles térmicos y mezclas de reacción reportadas por los autores con algunas modificaciones (21-23).

Para complementar la determinación taxonómica de los quirópteros capturados, se realizó una PCR con los iniciadores Bat_Cytb_1 (24) y Bat_Cytb_2 (25) que amplifican una región de Citocromo B, bajo las condiciones descritas por (26). El ADN templado se obtuvo de sangre de quirópteros. Los productos de amplificación

fueron clonados y secuenciados (forward y reverse) y las secuencias sometidas a BLAST-N en el GenBank.

El proceso de clonación molecular se realizó con el kit pGEM®-T Easy Vector Systems siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de amplificación fueron ligados al vector y posteriormente, utilizado en el proceso de transformación de las células competentes DH5 α . Las bacterias transformantes fueron plaqueadas sobre medio LB sólido con ampicilina. Las colonias recombinantes fueron seleccionadas, picadas y transferidas a medio líquido TB con ampicilina e incubadas durante 16 horas a 37°C en agitación constante.

Para determinar el éxito del proceso de clonación se realizó una PCR de confirmación con los iniciadores correspondientes a cada región. Las bacterias recombinantes obtenidas fueron precipitadas por centrifugación y sometidas al procedimiento de extracción de ADN plasmídico utilizando el kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System siguiendo las instrucciones del fabricante.

El secuenciamiento se realizó con el sistema ABI PRISM 4000, con los iniciadores universales M13F/R que hibridan sobre el plásmido recombinante en las regiones que flanquean el inserto.

Las secuencias fueron refinadas manualmente con el programa SeqMan II versión 5.0 (27). Con el propósito de conocer de manera preliminar la identidad taxonómica de los individuos, se realizó un alineamiento local

con el programa BLAST (Basic Alignment Sequence Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology) (28). Una vez refinadas las secuencias se realizaron alineamientos múltiples para cada marcador molecular utilizando el programa Gene Doc versión 2.7.0. (29).

Con las secuencias completas, refinadas y alineadas se realizaron los análisis utilizando el paquete Paup versión 4.0b10 (30) para los análisis filogenéticos por máxima parsimonia y el programa “RAxML” versión 7.0.3. (31) para el análisis de máxima verosimilitud. En ambos casos los análisis fueron diseñados con un bootstrap de 100 réplicas con el propósito de brindar apoyo estadístico a las topologías de los árboles filogenéticos inferidos.

RESULTADOS

Se capturaron 82 individuos en 4 diferentes localidades del departamento del Tolima (Figura 1) encontrando 15

hemocultivos positivos con un porcentaje de positividad de 18,3% como se observa en la tabla 1.

De acuerdo a los datos obtenidos por taxonomía tradicional y el análisis de secuencias se logró establecer las especies de hospedero para cada uno de los aislados obtenidos encontrando a *Phyllostomus discolor*, *P. hastatus*, *Carollia perspicilata* y *Artibeus lituratus*, como se relaciona en la tabla 2.

En el proceso de caracterización molecular los productos de amplificación obtenidos para los 15 aislados mostraron un fragmento de 900 pb en todos los aislados utilizando los iniciadores 609F y 706R (figura 2); un fragmento de 500 pb con los iniciadores DTO154 y DTO155 (figura 3) y en la PCR con los iniciadores IR1/5,8R se obtuvo un fragmento de 500 pb para los aislados A10 y A11 y un fragmento de 900 pb para los demás aislados (figura 4).

Tabla 1. Quirópteros capturados por localidad y porcentaje de positividad

Localidad	Individuos Capturados	Individuos positivos	% positividad
SL-Payande	18	5	28
Ibagué	26	0	0
Ortega	17	6	35
Chaparral	21	4	24
Total	82	15	18,3

Tabla 2. Información de los Aislados (localidad, hospedero y especie de tripanosoma)

Aislado	Localidad	Especie hospedero	Especie de tripanosoma
A1	SL-Payande	<i>Phyllostomus discolor</i>	<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>
A2	SL-Payande	<i>Phyllostomus discolor</i>	<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>
A3	SL-Payande	<i>Phyllostomus discolor</i>	<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>
A4	SL-Payande	<i>Phyllostomus discolor</i>	<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>
A5	SL-Payande	<i>Phyllostomus discolor</i>	<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>
A6	Ortega	<i>Artibeus literatus</i>	<i>Trypanosoma cruzi bat</i>
A7	Ortega	<i>Artibeus literatus</i>	<i>Trypanosoma cruzi bat</i>
A8	Ortega	<i>Artibeus literatus</i>	<i>Trypanosoma cruzi bat</i>
A9	Ortega	<i>Carollia perspicilata</i>	<i>Trypanosoma cruzi bat</i>
A10	Ortega	<i>Artibeus literatus</i>	<i>Trypanosoma rangeli</i>
A11	Ortega	<i>Artibeus literatus</i>	<i>Trypanosoma rangeli</i>
A12	Chaparral	<i>Artibeus literatus</i>	<i>Trypanosoma cruzi bat</i>
A13	Chaparral	<i>Artibeus literatus</i>	<i>Trypanosoma cruzi bat</i>
A14	Chaparral	<i>Carollia perspicilata</i>	<i>Trypanosoma cruzi bat</i>
A15	Chaparral	<i>Phyllostomus hastatus</i>	<i>Trypanosoma cruzi marinkellei</i>

A partir de la metodología aplicada a los 15 aislados (Tabla 2) se obtuvieron 5 secuencias completas para cada uno, las cuales fueron corregidas, editadas, alineadas y posteriormente depuradas, dejando aquellas que presentan algún grado de variación en los filogramas.

Para la región V7-V8 de la SSU ADNr se ubicaron 6 aislados caracterizados como *Trypanosoma cruzi marinkellei*, 7 como *T. cruzi bat*, y 2 como *T. rangeli*, como se muestra en la figura 5 y 6 y se resume en la tabla 2.

Con base a estos resultados se avanzó en la caracterización de los aislados determinados como *Trypanosoma rangeli* y *T. cruzi bat*, los cuales fueron sometidos a análisis con los marcadores moleculares ITS1 y CATL con el fin de confirmar la ubicación taxonómica y filogenética obtenida en primera instancia.

Para el caso de *Trypanosoma rangeli*, a través de los análisis efectuados a las secuencias de ITS1 Y CATL

se determinó que los aislados 10 y 11 corresponden al linaje C de esta especie (14, 21) como se observa en las figuras 7 y 8.

Por otro lado, para el caso de *Trypanosoma cruzi bat* se analizaron las secuencias con el propósito de confirmar que los aislados caracterizados en primera instancia correspondieran a este linaje como se observa en las figuras 9 y 10.

DISCUSIÓN

De las 8 especies de tripanosomas reportadas en quirópteros de Colombia (9-11) encontramos 3 de ellas. *Trypanosoma cruzi* representada en este caso por la más reciente de sus DTU's *T. cruzi bat*; *T. rangeli* representada por su linaje C y *T. cruzi marinkellei*.

Trypanosoma rangeli es un tripanosoma que circula en diferentes hospederos y ha sido reportado infectando in-

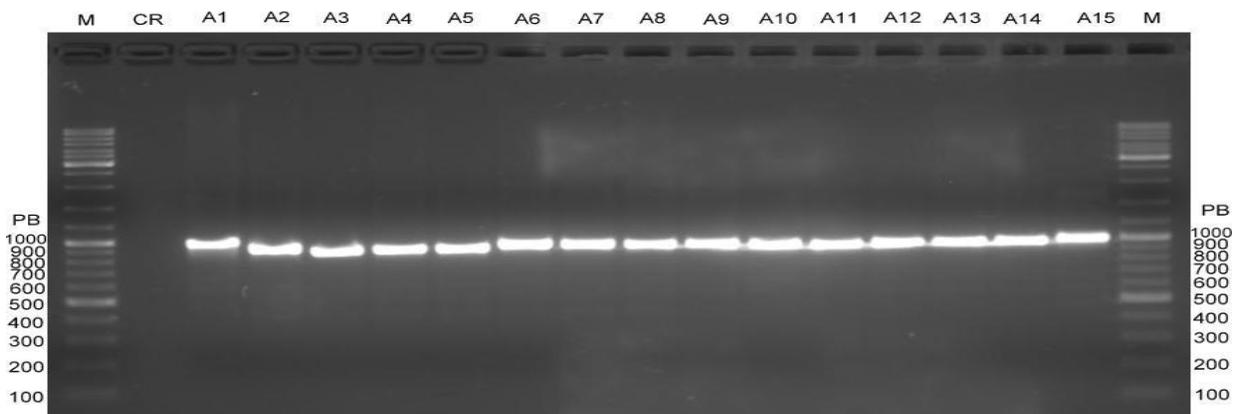


Figura 2. Productos de amplificación obtenidos con los iniciadores 609F y 706R para la SSU ADNr (Agarosa al 2%, coloreado con gelred)

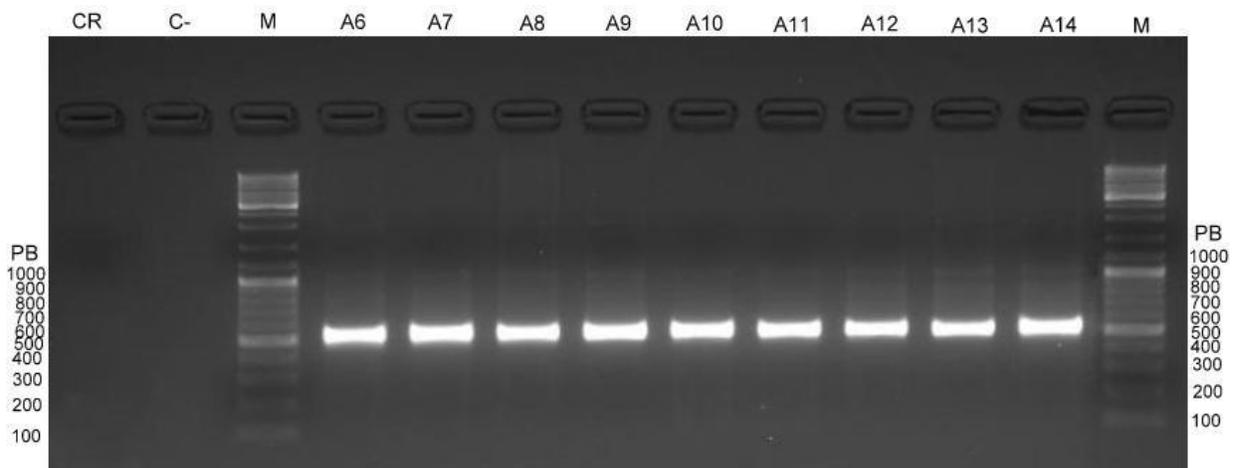


Figura 3. Productos de amplificación obtenidos con los iniciadores DTO 154 y DTO 155 para CATL (Agarosa al 2%, coloreado con gelred)

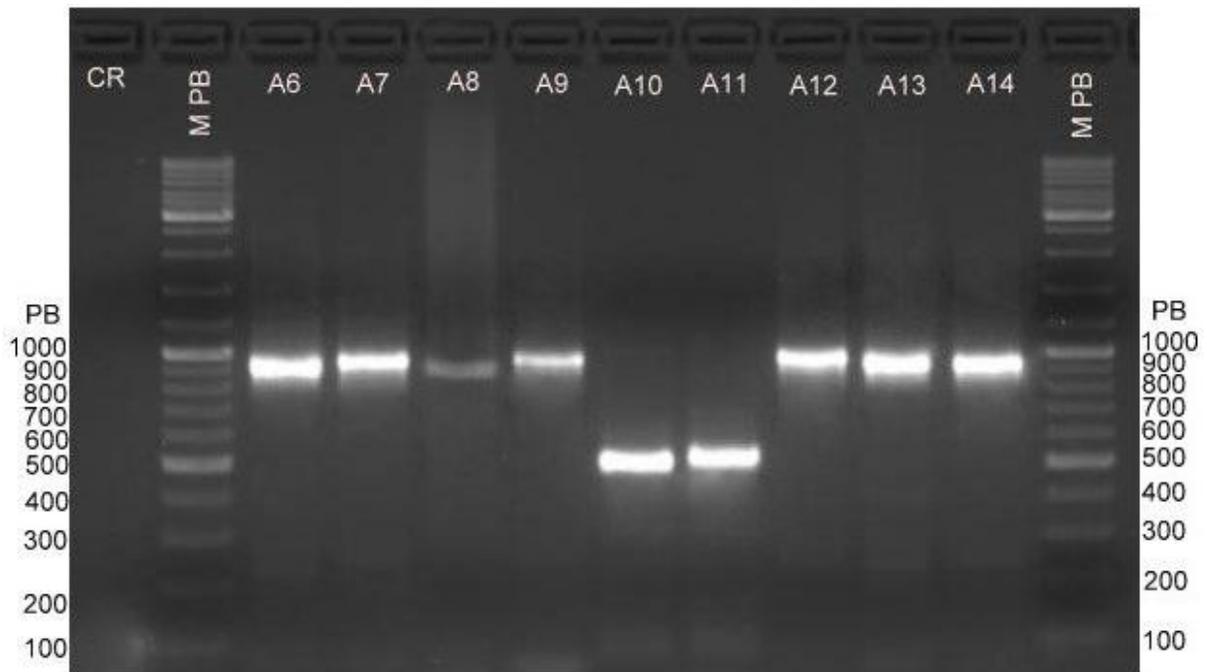
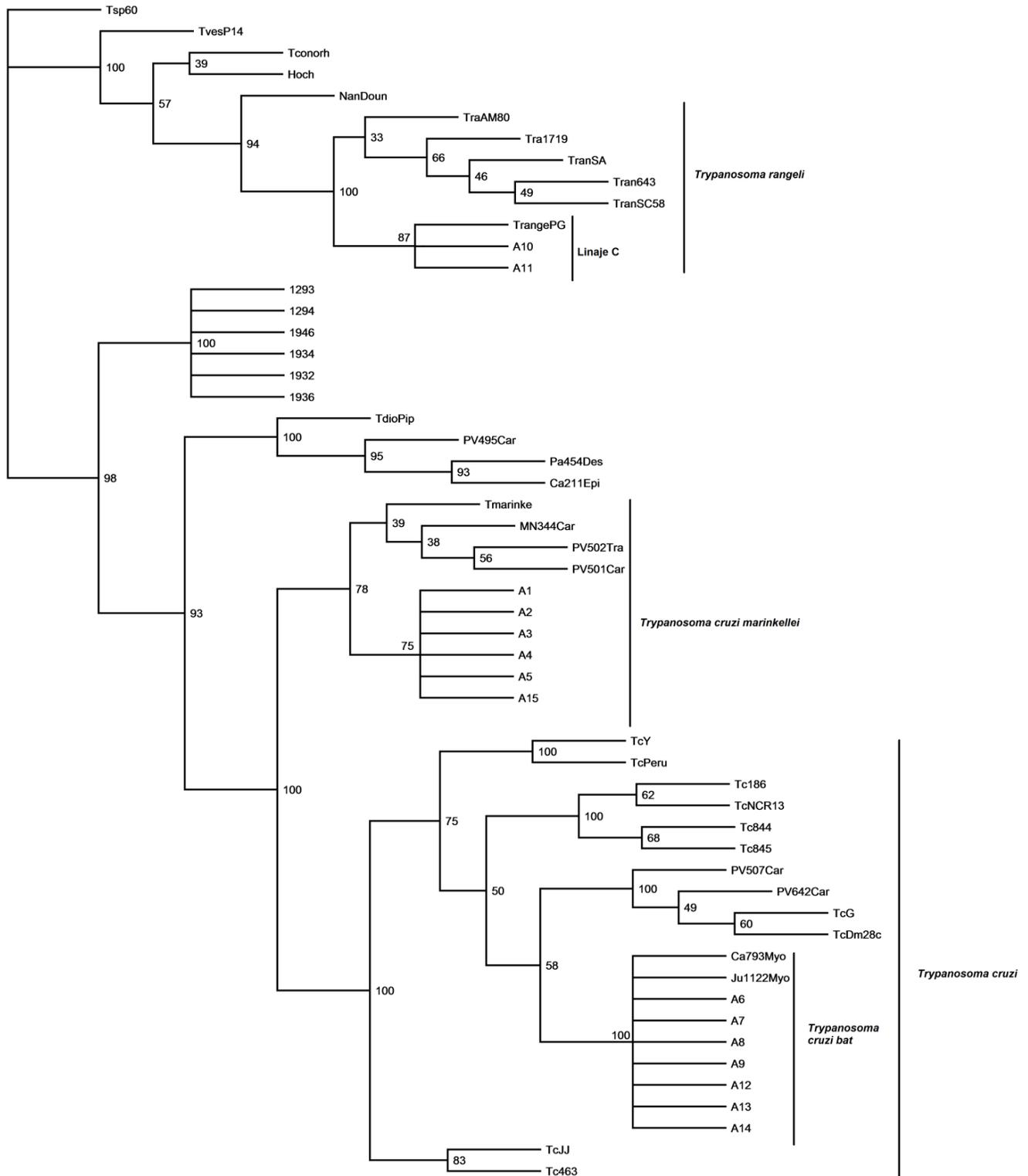


Figura 4. Productos de amplificación obtenidos con los iniciadores IR1 y 5,8R para el espaciador transcrito interno 1 del cistrón ribosomal (Agarosa al 2%, coloreado con gelred)



10

Figura 5. Árbol filogenético inferido por máxima parsimonia de la región V7-V8 de la SSU ADNr.

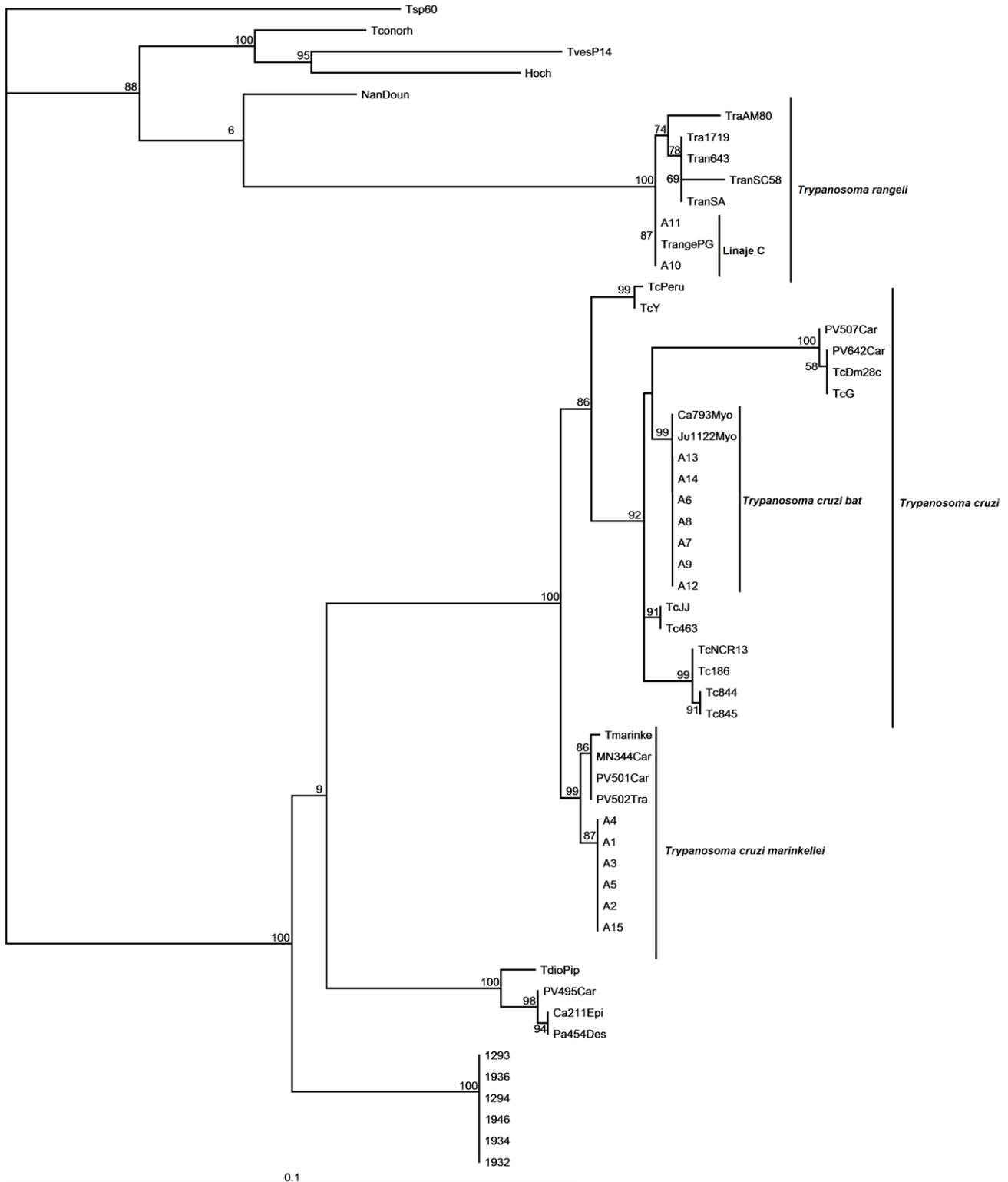


Figura 6. Árbol filogenético inferido por máxima verosimilitud de la región V7-V8 de la SSU ADNr.

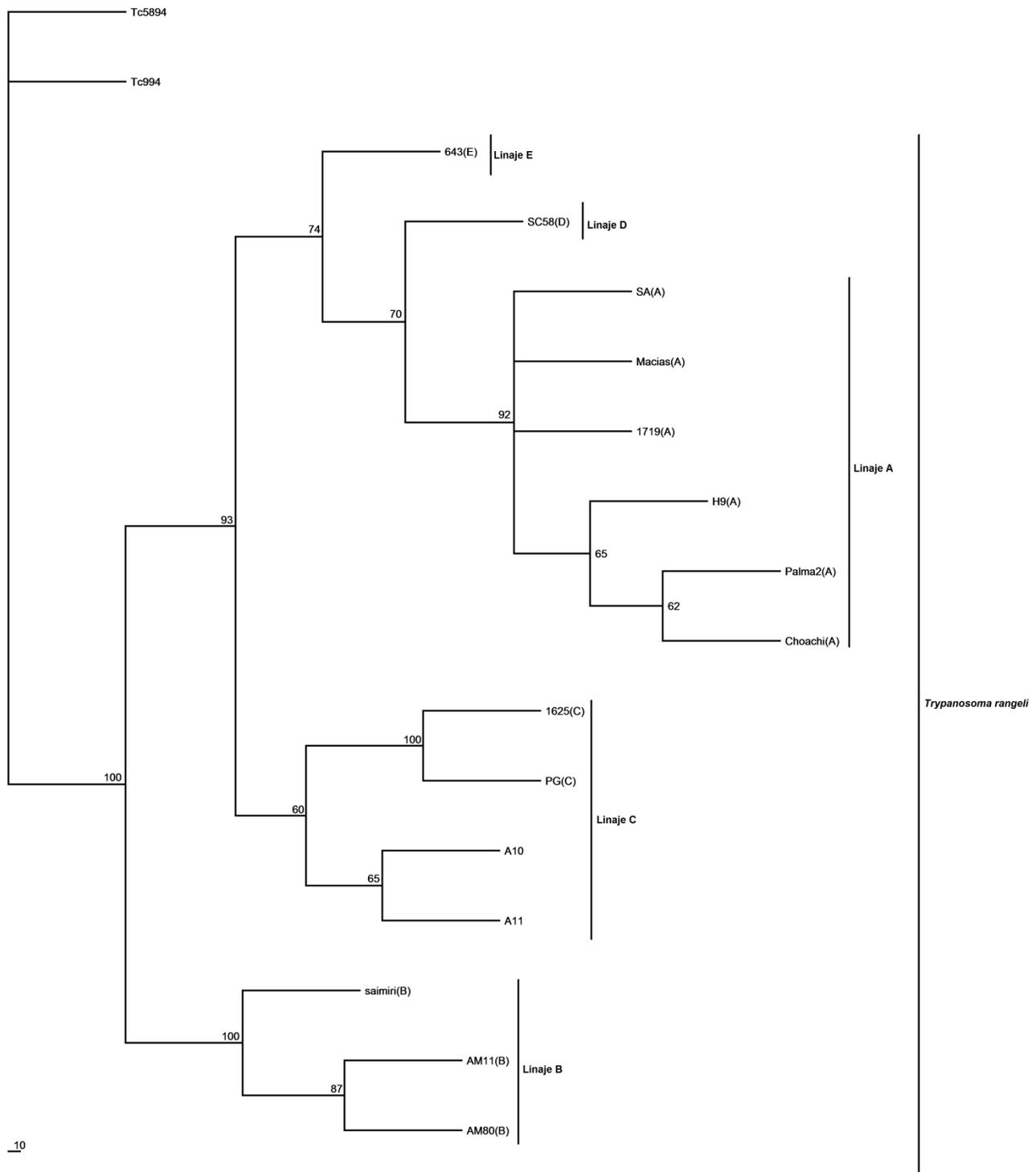


Figura 7. Árbol filogenético inferido por máxima parsimonia de ITS1 del cistrón ribosomal de *Trypanosoma rangeli*.

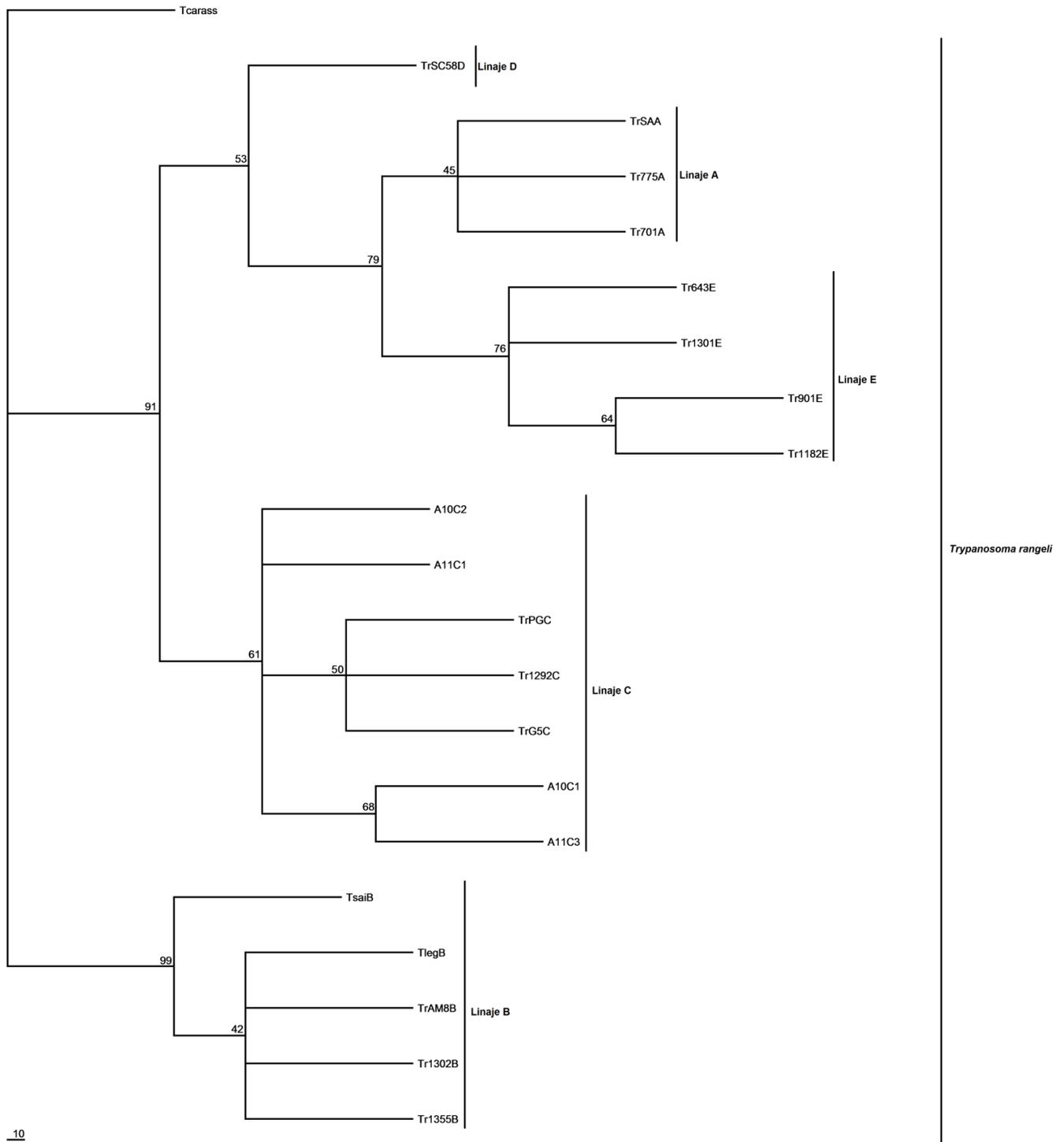
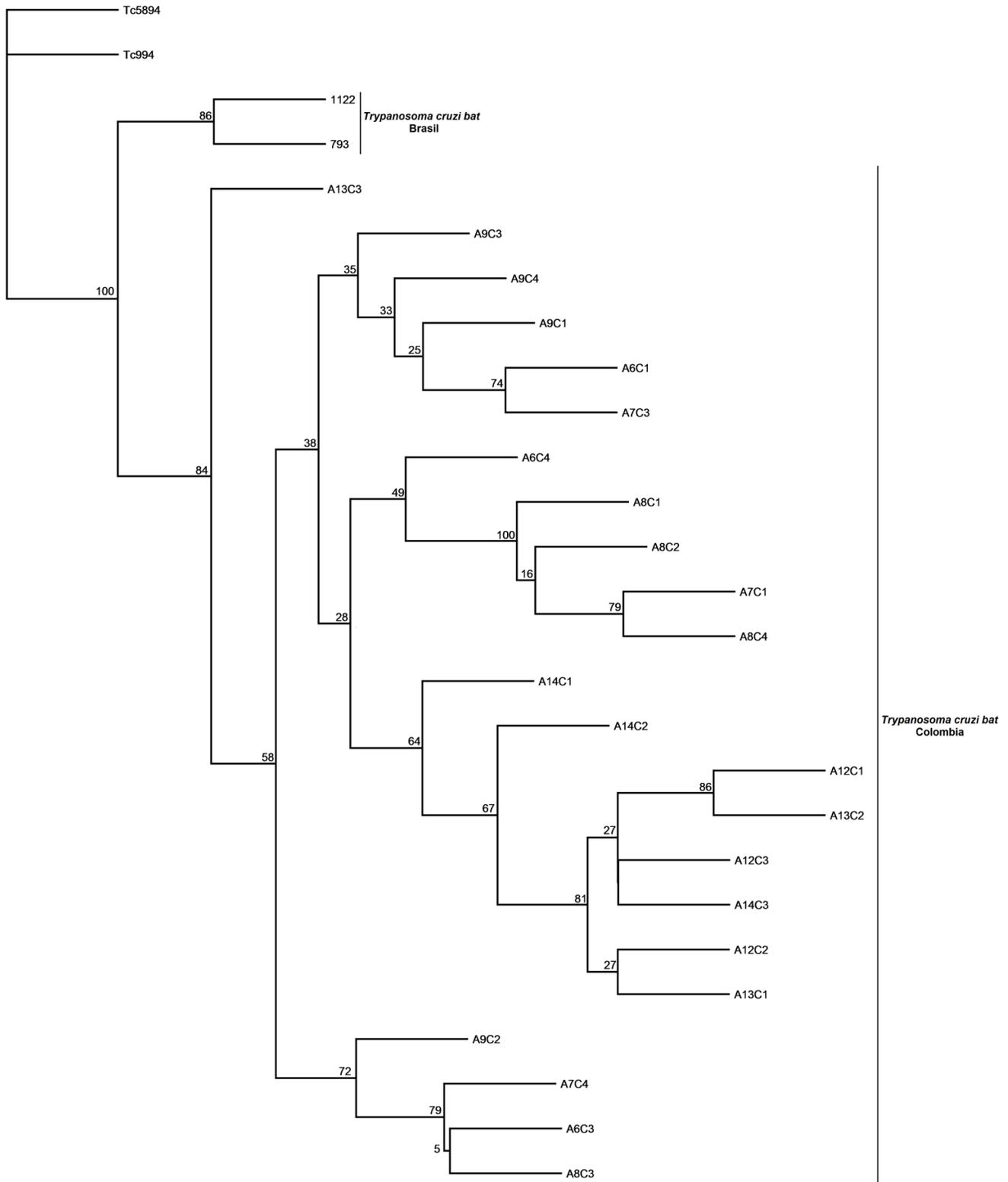


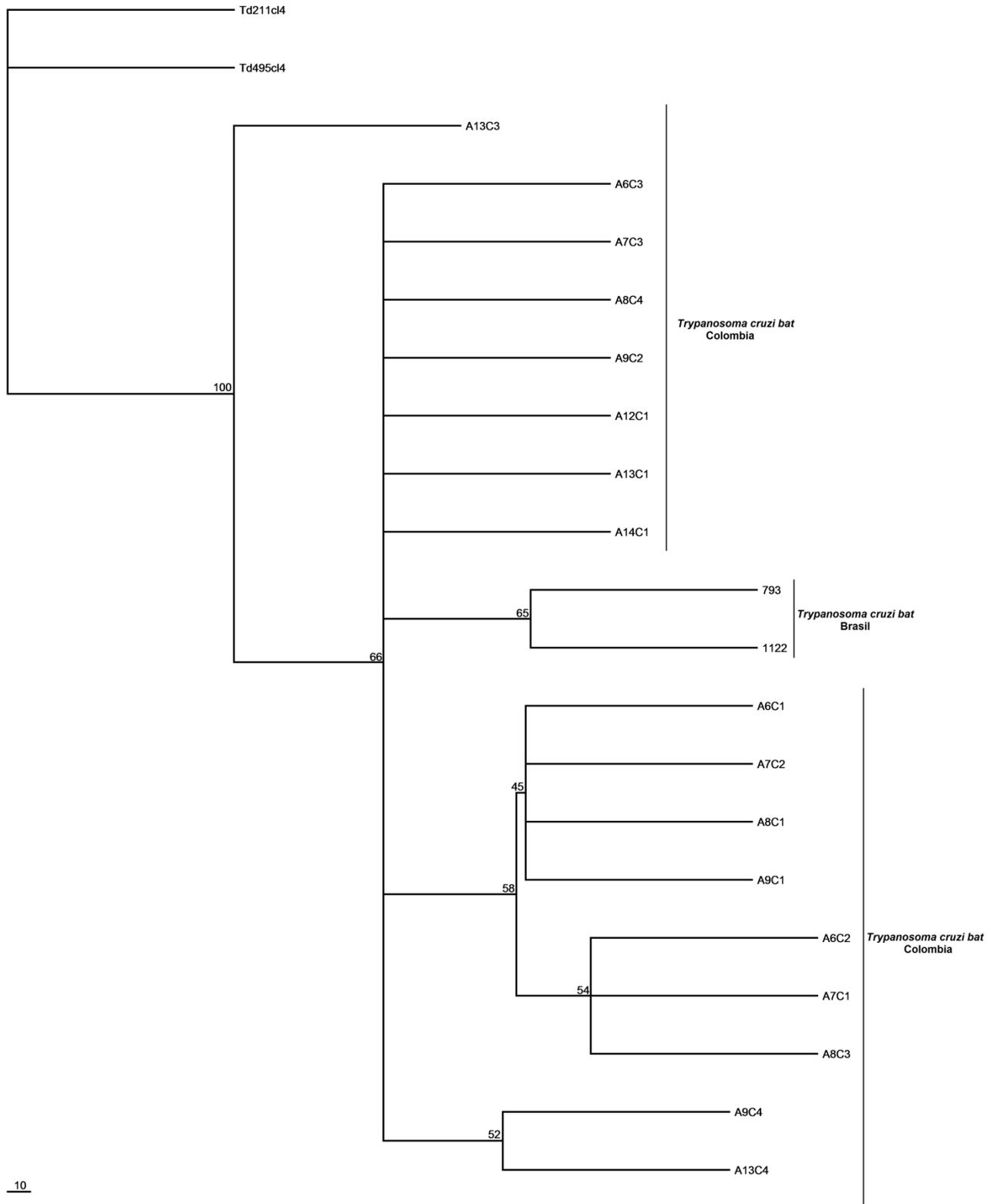
Figura 8. Árbol filogenético inferido por máxima parsimonia del gen CATL de *Trypanosoma rangeli*.

10



¹⁰

Figura 9. Árbol filogenético inferido por máxima parsimonia de ITS1 del cistron ribosomal de *Trypanosoma cruzi bat*.



10

Figura 10. Árbol filogenético inferido por máxima parsimonia del gen CATL de *Trypanosoma cruzi bat*.

sectos triatominos, humanos y quirópteros (32-37), para estos últimos, los aislados fueron determinados como linaje A y recientemente se reportó un nuevo genotipo capaz de infectar estos mamíferos, el linaje E (14). Un reporte reciente para Colombia (11) no discrimina el linaje al cual pertenece el *Trypanosoma rangeli* detectado en quirópteros colombianos. En el presente trabajo se determinó mediante análisis molecular que los aislados obtenidos para esta especie pertenecen al linaje C, hecho que se constituye en un nuevo reporte para este linaje infectando la fauna quiróptera.

Para el caso de *Trypanosoma cruzi bat*, nuestros datos constituyen el cuarto reporte a nivel mundial (11, 15, 38), el segundo reporte de este flagelado en Colombia y el primero en el Tolima y la región andina de Colombia; en donde los resultados obtenidos del análisis de las secuencias de la región V7-V8 muestran una agrupación clara con las secuencias previamente reportadas de las cepas de referencia en el Genbank.

El hallazgo de *Trypanosoma cruzi marinkellei* se convierte en un reporte reciente de este flagelado en el departamento del Tolima después de lo reportado por (39) Marinkelle en 1982 (39).

CONCLUSIONES

Los análisis de secuencias permitieron determinar taxonómicamente los tripanosomas observando agrupaciones claras que permiten tener mayor certeza que efectuando comparaciones en los tamaños de los productos de amplificación por PCR.

El presente trabajo muestra que la fauna quiróptera del Tolima presenta una dinámica de transmisión activa para diferentes especies de tripanosomas, incluyendo las especies de importancia médica.

Los resultados permiten ubicar a *Trypanosoma cruzi bat* y *T. rangeli* linaje C y *T. cruzi marinkellei* como hemoparásitos de transmisión activa en el departamento del Tolima y Colombia.

En el presente trabajo logramos establecer cultivos *in vitro* recientes de *T. cruzi*, *T. rangeli* linaje C y *T. cruzi marinkellei*, determinados y caracterizados, que pueden ser material importante en futuros trabajos de investigación.

AGRADECIMIENTOS

A Uriel Alvarado, Catalina Serrato y Daniel Zabala por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Simmons N. Mammalian Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference in Mammals species of the world. Unites States of America: Johns Hopkins University Press; 2005.
2. Nowak R. Walker's mammals of the world. Unites States of America: Johns Hopkins University Press; 1991.
3. Guyatt KJ, Twin J, Davis P, Holmes EC, Smith GA, Smith IL, et al. A molecular epidemiological study of Australian bat lyssavirus. *Journal of General Virology*, 2003; 84: 485-496.
4. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, et al. Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. *Science*, 2005; 310: 676-679.
5. Halpin K, Young PL, Field HE, Mackenzie JS. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *Journal of General Virology*. 2000; 81: 1927-1932.
6. Hamilton PB, Cruickshank C, Stevens JR, Teixeira MMG, Mathews F. Parasites reveal movement of bats between the New and Old Worlds. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2012a; 63: 521-526.
7. Hamilton PB, Teixeira MMG, Stevens JR. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the bat-seeding hypothesis. *Trends in Parasitology*. 2012b; 28: 136-141.
8. Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ, Gibson W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Advanced Parasitology*, 2001; (48): 1-56.
9. Hoare C. The Trypanosomes of mammals. London UK: Blackwell scientific publications. 1972.
10. Marinkelle CJ. Biology of the Trypanosomes of Bats in Biology of the Kinetoplastida. London UK: Academic Press. 1976.
11. Ramirez JD, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendon LM, Hincapie E, et al. Trypanosome species in Neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infection, Genetics and Evolution* (En prensa). 2013.
12. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M., Macedo AM, Teixeira MMG, Schijman AG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012; 12(2): 240-253.
13. Grisard EC, Sturm NR, Campbell DA. A new species of trypanosome, *Trypanosoma desterrensis* sp. n., isolated from South American bats. *Parasitology*. 2003;127: 265-271.

14. Maia F, Marcili A, Lima L, Jr MC, Ortiz PA, Campaner M, Takeda GF, et al. (2009). *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil : Genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Tropica*, 2009;109: 199–207.
15. Marcili A, Lima L, Cavazzana MJ, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia da Silva F, et al. (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*, 2009; 136: 641–655.
16. Lima L, Maia Da silva F, Neves L, Attias M, Takata C, Campaner M, et al. 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*, 2012;163: 856–872.
17. Camargo EP. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical do São Paulo*, 1964;6: 93-100.
18. Novy FG, McNeal WJ. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Infection. Diseases* 1904;1: 1.
19. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
20. Bruford MW, Hanotte O, Brookfield JFY, Burke T. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Oxford, UK: IRL Press. 1998.
21. Maia Da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Brigido MC, Junqueira CV, Coura JR, et al. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology*, 2004; 128(3): 283–294.
22. Cupolillo E, Grimaldi JRG, Hooman M, Berveley SM. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 1995; 75: 145-155.
23. Lima APCA, Tessier DC, Thomas DY, Scharftein J, Stoner AC, Vernet T. Identification of new cysteine protease gene isoforms in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 1994;67: 333-338.
24. Li G, Jones G, Rossiter S, Chen S, Parsons S, Zhang S. Phylogenetics of small horseshoe bats from East Asia based on mitochondrial DNA sequence variation. *Journal of Mammalogy*, 2006; 87: 1234–1240.
25. Zhang JS, Han NJ, Jones G, Lin LK, Zhang JP, Zhu GJ, et al. A new species of *Barbastella* (Chiroptera: Vespertilionidae) from north China. *Journal of Mammalogy*, 2007; 88: 1393–1403.
26. Cui J, Han N, Streicker D, Li G, Tang X, Shi Z, et al. Evolutionary relationships between bat coronavirus and their hosts. *Emerging Infectious Diseases*, 2007;13: 526–1532.
27. Swindell S, Plasterer T. SEQMAN: Contig Assembly in Sequence Data Analysis Guidebook. Nottingham, UK: Humana Press. 1996.
28. Altschul SF, Gish W, Miller W, Meyers EW, Lipman DJ. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990; 215: 403-410.
29. Nicholas KB, Nicholas HBJ, Deerfield DW. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnew news*, 1997; 4: 1.
30. Swofford DL. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. vol. 4.” Version 4, 2003: b10a.
31. Stamatakis A. “RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 2006; 22 (21): 2688-2690.
32. Vallejo GA. Estadios entre las secuencias de KDNA de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* y su aplicación en el diagnóstico molecular de la tripanosomiasis americana. *Actual Biology*, 1998; 20: 43-56.
33. Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, De Sánchez N. Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en el intestino vector *Rhodnius prolixus*. *Revista Brasileira de Biología*, 1988; 3: 577 - 587.

34. Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo A. Species-specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Tropica*, 1999; 72: 203-212.
35. Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Cuba Cuba CA, Schofield CS, Triana O. Interaction between *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* spp: a model for molecular epidemiology in American trypanosomiasis. *Medimond Monduzzi Intl. Proc. Bologna, Italy*, 2004; 1: 121-128.
36. Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 review. *Memorias do Oswaldo Cruz*, 2003; 98: 435 – 442.
37. Guhl F, Marinkelle CJ. Antibodies against *Trypanosoma cruzi*. *Annual Tropical Medicine Parasitology*, 2003; 76: 361 – 366.
38. Pinto CM, Kalko EK, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. 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*, 2012;12: 1328-1332.
39. Marinkelle CJ. Prevalence of *Trypanosoma cruzi*-like infection of Colombian bats. *The Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1982; 76 (2): 125-134.