



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

“Diagnóstico serológico y molecular de *Trypanosoma cruzi* en
perros domésticos de la Zona Metropolitana de Querétaro”

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctorado en Ciencias Biológicas

PRESENTA

Salvador Zamora Ledesma

DIRIGIDO POR:

Norma Hernández Camacho

CO-DIRIGIDO POR:

Manuel Sánchez Moreno

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

**Diagnóstico serológico y molecular de *Trypanosoma cruzi* en perros
domésticos de la Zona Metropolitana de Querétaro**

Tesis

que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:

Doctorado en Ciencias Biológicas

Presenta

Salvador Zamora Ledesma

Dirigido por:

Norma Hernández Camacho

Co-dirigido por:

Manuel Sánchez Moreno

Norma Hernández Camacho

Presidente

María Elena Villagrán Herrera

Secretario

Gabriela Aguilar Tipacamú

Vocal

Hugo Antonio Ruiz Piña

Suplente

Manuel Sánchez Moreno

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (26 agosto de 2021)

México

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* y se transmite principalmente por los vectores hemípteros conocidos como triatóminos. Este parásito se puede encontrar tanto en humanos como en más de 150 especies de mamíferos, principalmente en los perros domésticos, quienes funcionan como uno de los hospederos principales en el ciclo doméstico de la enfermedad. En Querétaro existen registros de prevalencia a este parásito en perros y en humanos en zonas rurales, sin embargo, no hay datos para la ciudad de Querétaro y tampoco se conoce como pudieran estar interactuando los perros en el ciclo de transmisión de este parásito en esta ciudad y sus alrededores, por lo que es importante comparar la prevalencia de perros afectados por *T. cruzi*. En este estudio se tomaron muestras sanguíneas de perros domésticos y ferales de la zona urbana y perirubana de la ciudad de Querétaro para conocer si se encuentra este parásito en nuestra ciudad, además de saber que tipo de linaje está presente en el ciclo de transmisión y si estos perros que sean positivos a *T. cruzi* pudieran estar en contacto con los vectores en el ambiente doméstico.

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	7
La enfermedad de Chagas	7
Tripanosomiasis americana en México	9
El papel de <i>Canis lupus familiaris</i> en la enfermedad de Chagas	10
Vectores de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
ÁREA DE ESTUDIO	16
La Zona Metropolitana y la Zona Conurbada de Querétaro	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	20
1. SEROPOSITIVIDAD A <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EN PERROS DE LA ZONA METROPOLITANA DE QUERÉTARO	26
1.1. Introducción	26
1.2. Materiales y Métodos	30
1.2.1. Obtención de muestras de perros domésticos.	30
1.2.2. Análisis serológico (ELISA indirecto y Western Blot) de las muestras de sangre.	30
Análisis de Western Blot.	31
1.2.3. Análisis estadístico	32
1.3. Resultados	33
1.3.1. Obtención de muestras	33
1.3.2. Análisis serológico (ELISA indirecto)	33
1.3.3. Análisis serológico (Western Blot)	33
1.3.4. Análisis estadístico	35
1.4. Conclusión	40

1.5. Referencias	42
2. DETERMINACIÓN DE LINAJES DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> PRESENTES EN EL CICLO DE TRANSMISIÓN DOMÉSTICO EN LA ZONA METROPOLITANA DE QUERÉTARO	47
2.1. Introducción	47
2.2. Materiales y Métodos	49
2.2.1. Obtención de muestras	49
2.2.2. Presencia de <i>T. cruzi</i> en perros	49
2.2.3. Linajes de <i>T. cruzi</i>	50
2.3. Resultados	52
2.3.1. Positividad a <i>T. cruzi</i>	52
2.3.2. Linajes de <i>T. cruzi</i>	52
2.4. Conclusión	53
2.5. Referencias	55
3. DISTRIBUCIÓN POTENCIAL DE TRIATÓMINOS EN EL ESTADO DE QUERÉTARO	57
3.1. Introducción	57
3.2. Materiales y métodos	59
3.2.1. Distribución potencial	59
3.3. Resultados	60
3.3.1. Distribución potencial de Triatóminos	60
3.4. Conclusión	65
3.5. Referencias	66
4. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS: INTERACCIÓN ENTRE PERROS Y TRIATÓMINOS EN LA ZONA METROPOLITANA DE QUERÉTARO	68
4.1. Introducción	68
4.2. Materiales y métodos	70
4.3. Resultados	70
4.4. Discusión y conclusiones	72
4.5. Referencias	74

5. ANEXO	77
Publicación indizada: “Seropositivity for <i>Trypanosoma cruzi</i> and <i>Leishmania mexicana</i> in dogs from a metropolitan region of Central Mexico”	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	8
Fig. 2. Reservorios y hospederos de <i>T. cruzi</i> en México.	12
Fig. 3. Triatóminos registrados en el estado de Querétaro.	15
Fig. 4. Zona Conurbada y Metropolitana de la ciudad de Querétaro.	17
Fig. 5. Mapa de los registros de <i>T. cruzi</i> en perros de México.	28
Fig. 6. Placa de ELISA con muestras de suero de perro positivas (color oscuro) y negativas (color claro) a <i>Trypanosoma cruzi</i> .	34
Fig. 7. Tiras de ensayo de Western Blot con muestras de suero de perro positivas (banda marcada) a <i>Trypanosoma cruzi</i> .	37
Fig. 10. Mapa de la distribución potencial de <i>Triatoma mexicana</i> para el estado de Querétaro	61
Fig. 11. Mapa de la distribución potencial de <i>Triatoma barberi</i> para el estado de Querétaro.	62
Fig. 12. Mapa de la interacción entre los puntos de captura de perros positivos a <i>T. cruzi</i> y la distribución potencial de <i>Triatoma barberi</i> en la Zona Metropolitana de Querétaro	71

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas es provocada por el protozooario *Trypanosoma cruzi* transmitida vectorialmente por hemípteros de la subfamilia Triatominae (Molyneux y Ashford, 1983). Se estima que existen alrededor de seis a ocho millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi*, principalmente en Latinoamérica, en donde se le considera endémica, sin embargo, recientemente se han registrado personas con este parásito en Estados Unidos, Canadá, algunos países europeos y del Pacífico Occidental; actualmente es considerada dentro de las nueve enfermedades tropicales olvidadas de carácter prioritario para investigación y control por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010). Actualmente no existe cura para esta enfermedad, sin embargo, existen tratamientos comerciales para la fase temprana (aguda), además, se está trabajando con diferentes compuestos como terapias alternativas para eliminar esta enfermedad en las diferentes fases del mal de Chagas (Marín et al., 2017; Martín-Escolano et al., 2018; Moya et al., 1985).

Trypanosoma cruzi tiene un ciclo de vida diheteroxeno, es decir, cumple su ciclo de vida en dos etapas (Fig. 1) (Molyneux and Ashford, 1983). Una etapa lo cumple dentro de los hospederos mamíferos, y otra etapa la cumple dentro de los insectos vectores. La etapa en los hospederos inicia cuando son picados y defecados por un triatómino. En las heces se encuentran los tripomastigotes metacíclicos, la fase infectiva del parásito. Los tripomastigotes metacíclicos entran a torrente sanguíneo por la herida causada por la picadura,

buscando células para infectar. Una vez dentro de una célula, los tripomastigotes se transforman en amastigotes, la fase replicativa dentro del hospedero, para comenzar la proliferación. Los amastigotes se transforman en tripomastigotes sanguíneos y rompen la célula para salir a torrente sanguíneo en búsqueda de nuevas células para infectar. La otra etapa comienza cuando un triatómino pica y se alimenta de un hospedero infectado, succionando sangre con tripomastigotes sanguíneos. Los tripomastigotes llegan al intestino medio del vector y se transforman en epimastigotes, la forma replicativa dentro del triatómino. Una vez que se multiplican los epimastigotes, se transforman en tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior. Cuando el triatómino vuelve a alimentarse, se llenan y defecan, liberando los tripomastigotes metacíclicos en un nuevo

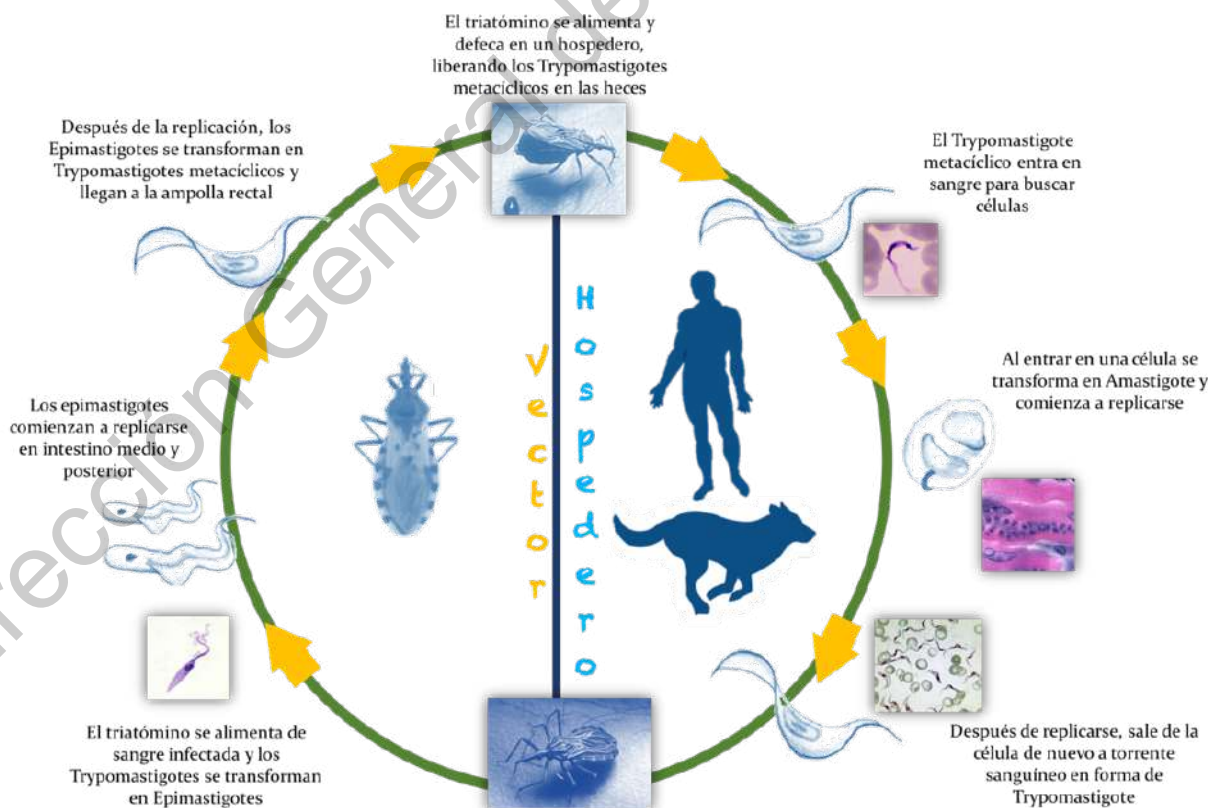


Fig. 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. De lado izquierdo se observa el estadio dentro del vector, mientras que de lado derecho se observa el estadio dentro de los hospederos/reservorios (Zamora-Ledesma, 2017)

hospedero (Tyler and Engman, 2001).

Tripanosomiasis americana en México

En nuestro país, los estudios al respecto a la tripanosomiasis americana son escasos y poco recientes, siendo regionales en la mayoría de los casos. En 1992 se llevó a cabo una encuesta epidemiológica para conocer la prevalencia general de tripanosomiasis americana en el país, en la que se registró una prevalencia del 5.8% como valor más alto en estados donde esta enfermedad es endémica, como Chiapas y Oaxaca (Velasco-Castrejon et al., 1992).

Para el centro del país, y particularmente en el estado de Querétaro, se han llevado a cabo diferentes estudios para evaluar la prevalencia de *T. cruzi* en humanos, tanto en poblaciones rurales como en la ciudad de Querétaro. Los primeros registros de este parásito en la región son de Villagrán et al., (2005), quienes estudiaron la prevalencia de *T. cruzi* en poblaciones rurales de 11 municipios de Querétaro, para la cual registraron valores de 8.16%, que son altos en comparación a los estados colindantes, considerados como zona no endémica de esta enfermedad, y que presentaron valores menores al 3.2% (Velasco-Castrejon et al., 1992; Villagrán et al., 2005). Posteriormente se llevaron a cabo más estudios para darle seguimiento a la transmisión de este parásito, como el de López-Céspedes et al., (2012), quienes evaluaron poblaciones humanas del área periurbana de la ciudad de Querétaro, donde encontraron una prevalencia del 11.6%, más alta que la registrada previamente por Villagrán et al., (2005). Desde entonces no se han llevado a cabo más estudios al respecto.

Otro aspecto importante en donde se ha centrado la investigación de esta enfermedad es la riqueza y abundancia de sus vectores artrópodos.

El papel de *Canis lupus familiaris* en la enfermedad de Chagas

Los humanos no son el único hospedero de este parásito, en el ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* participan como hospederos diversas especies de mamíferos domésticos y/o silvestres entre los que se han registrado más de 150 especies, considerando a los mapaches (*Procyon lotor*) y zarigüeyas (*Didelphis virginiana*) como reservorios principales de este parásito en Norte América, incluyendo México (Brown *et al.*, 2010; Ruiz-Piña y Cruz-Reyes 2012).

Hay que tomar en cuenta que en la transmisión de *Trypanosoma cruzi* se tienen diferenciados tres ciclos, selvático, peridoméstico y doméstico. En cada uno de estos ciclos intervienen especies con hábitos distintos. Para el ciclo selvático, las especies de mamíferos que intervienen son en su mayoría de hábitos silvestres. Las especies con mayores registros en Latinoamérica son las zarigüeyas (*Didelphis*), oso hormiguero (*Tamandua*), armadillo (*Dasypus*), murciélagos, y roedores (Brown *et al.*, 2010; Herrera, 2010; Molyneux and Ashford, 1983). En este ciclo existen diferentes formas de transmisión, desde la vectorial en los nidos de roedores donde se encuentran habitando los triatóminos de hábitos silvestres, la transmisión oral, por la ingesta de una presa infectada o por alimentarse de triatóminos con el parásito, hasta la transmisión por contacto con fluidos infectados, sea sangre o secreciones de glándulas con nidos de

amastigotes. Para que un humano se infecte en este ciclo, debe tener contacto directo con un animal infectado o con los vectores silvestres.

En el ciclo peridoméstico, las especies que intervienen presentan hábitos sinantrópicos, es decir, que tienen tolerancia a las actividades humanas. Los roedores, las zarigüeyas y los mapaches son las especies con más registros de *T. cruzi* en este ciclo (Brown, 2008; Galaviz-Silva et al., 2017; Ruiz-Piña and Cruz-Reyes, 2002). Estos animales pueden tener contacto con los triatóminos de ambientes domésticos, con fauna doméstica y con los humanos, funcionando como enlace entre el ciclo selvático y el doméstico. La transmisión se puede dar por vía vectorial, vía oral por insectívora o depredación, y contacto con fluidos.

En el ciclo doméstico, las especies que intervienen son de hábitos domiciliarios, principalmente humanos y fauna doméstica. En este ciclo, los perros tienen un papel muy importante ya que pueden funcionar como puente entre el ciclo peri-doméstico y el doméstico (Jimenez-Coello et al., 2008; Longoni et al., 2011). La forma principal de transmisión en humanos es por vía vectorial, sin embargo, la transfusión sanguínea y trasplante de órganos también se consideran importantes (Organización Mundial de la Salud, 2010; Villagrán-Herrera y de Diego Cabrera, 2008). En la transmisión vectorial, los animales de compañía que se encuentran infectados por *T. cruzi* se consideran como hospederos principales, promoviendo la proliferación del parásito y su transmisión a otros hospederos (Brown et al., 2010; Herrera, 2010).



Fig. 2. Reservorios y hospederos de *T. cruzi* en México. En México existen pocos estudios sobre la fauna doméstica y silvestre como reservorio de *T. cruzi*. Los animales más estudiados son los perros domésticos (A) y las zarigüeyas (B) debido a su alta abundancia y a su movilidad entre distintos ambientes. En el ciclo doméstico también son importantes los gatos (B) y los ratones caseros como *Mus musculus* (C) por su contacto directo con los humanos y su movilidad entre ambientes doméstico y peridoméstico. Los zorrillos (E) y los roedores silvestres (F y G) son importantes en el ciclo peridoméstico por su conexión con el ciclo selvático. En el ciclo selvático, los animales que más importancia tienen son los armadillos (H) por su uso culinario en la cocina mexicana y los murciélagos (I) por su alta abundancia y riqueza de especies (Zamora-Ledesma, 2017).

Los cánidos se han registrado como hospederos para este parásito, principalmente los perros domésticos (*Canis lupus familiaris*), que juegan un papel muy importante en el ciclo doméstico de transmisión en ambientes urbanos, periurbanos y rurales, ya que pueden estar en contacto directo con los vectores o con fauna silvestre infectada por este parásito (Longoni et al., 2011). En el caso de México y en otros países de Latinoamérica, se han encontrado valores de prevalencia de *T. cruzi* en perros domésticos desde el 24% en Argentina hasta el 65% en Brasil (Solís-Franco et al., 1997; Estrada-Franco, 2006; Gürtler et al., 2007). En México se ha registrado a *T. cruzi* en perros de diferentes Estados, como en Yucatán, en la ciudad de Mérida se encontró una prevalencia del 14.4% de perros domésticos en ambiente urbano (Jimenez-Coello et al., 2008). En el Estado de México, se registró un 21% de prevalencia en perros de la ciudad de Toluca (Estrada-Franco, 2006). En Morelos se registró una prevalencia del 24.2%, en Puebla de 10%, ambas en ambientes periurbanos (Portugal-García et al., 2011; Sosa-Jurado et al., 2004). Particularmente en Querétaro, se cuentan con registros previos sobre la prevalencia de este parásito (42.8%) en perros domésticos de comunidades rurales (Villagrán et al., 2009; Zamora-Ledesma et al., 2016). Sin embargo, no se han registrado casos de perros con este parásito en la zona metropolitana de Querétaro.

Vectores de *Trypanosoma cruzi*

Los vectores de *Trypanosoma cruzi* son hemípteros de la familia Reduviidae, específicamente de la subfamilia Triatominae (Molyneux y Ashford, 1983). En

México se encuentran registradas 31 especies de triatóminos, de las cuales, 19 especies tienen hábitos domiciliarios, es decir, conviven directamente con los humanos adaptándose a las condiciones de las viviendas (Ramsey et al., 2015). Para el estado de Querétaro, actualmente se encuentran registradas seis especies, *Triatoma dimidiata*, *T. mexicana*, *T. pallidipennis* y *T. gerstaeckeri*, *T. longipennis* y *T. barberi* (Villagrán et al., 2008; Ramsey et al., 2015). *T. mexicana* y *T. barberi* son las de mayor número de registros en Querétaro y sus estados colindantes; ambas especies son de hábitos domiciliarios (Ramsey et al., 2015). *Triatoma mexicana* se encuentra registrada principalmente para la zona del semidesierto y la Reserva de la Biósfera Sierra Gorda localizada al norte del estado, mientras que *Triatoma barberi* se encuentra registrada para la zona periurbana de la ciudad de Querétaro (Salazar-Schettino et al., 2014). Esta especie se alimenta principalmente de sangre de humanos, perros y gatos ya que normalmente habita dentro de las viviendas humanas (Zárate et al., 1980) y es considerada como uno de los principales vectores de *T. cruzi* en el país (Ramsey et al., 2015).



Triatoma mexicana



Triatoma dimidiata



Triatoma gerstaeckeri



Triatoma barberi



Triatoma longipennis



Triatoma pallidipennis

Fig. 3. Triatóminos registrados en el estado de Querétaro. Las especies más abundantes son *Triatoma mexicana* y *T. barberi*

ÁREA DE ESTUDIO

La Zona Metropolitana y la Zona Conurbada de Querétaro

La Zona Metropolitana de Querétaro (ZMQ) es el conjunto de municipios en los que se distribuye la ciudad de Santiago de Querétaro. Debido al proceso de crecimiento de la ciudad, se fue expandiendo desde su núcleo original en el municipio de Querétaro, hacia los municipios vecinos de Humilpan, El Marqués y Corregidora, la extensión total de la ZMQ es de 207,036.22 hectáreas. Dentro de la ZMQ se encuentra la Zona Conurbada de Querétaro (ZCQ), es un conglomerado urbano que engloba el núcleo urbano y las localidades que antes eran rurales, la extensión total de la zona conurbada es de 15,544.20 hectáreas (PNUMA et al., 2008). La zona periurbana se trata de una transición entre las zonas urbanas y las zonas rurales, es el resultado del proceso de crecimiento de la ciudad y la absorción de los espacios rurales que la rodean (Ávila, 2009).

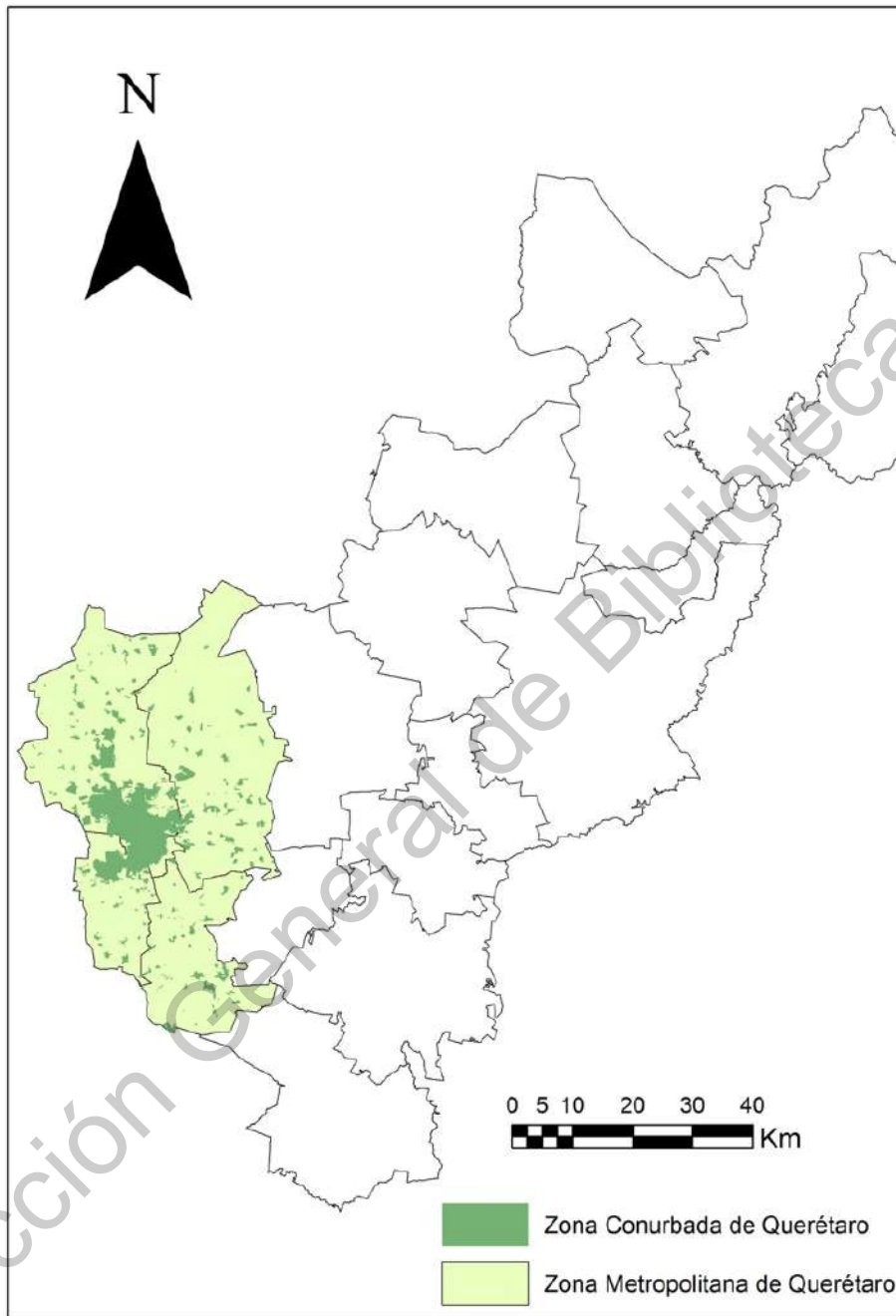


Fig. 4. Zona Conurbada y Metropolitana de la ciudad de Querétaro. Mapa del estado de Querétaro donde se muestra en color verde oscuro la Zona Conurbada de la ciudad de Querétaro, mientras que en verde claro se muestra la Zona Metropolitana de la ciudad de Querétaro (Zamora-Ledesma, 2017).

JUSTIFICACIÓN

La Enfermedad de Chagas es considerada una de las principales “enfermedades desatendidas” por la Organización Mundial de la Salud, esto como consecuencia de que, hasta el momento, no se ha encontrado cura, presenta síntomas generales durante su etapa aguda y es asintomática en la etapa crónica y registra una mayor prevalencia en áreas con mayor índice de marginación (OMS, 2010). Es importante conocer la prevalencia de este parásito en perros domésticos en zonas urbanas, peri-urbanas y rurales, principalmente en aquellas zonas en donde se sospecha su existencia pero se requiere de su confirmación formal, ya que se trata de uno de los hospederos de este parásito más cercanos al ser humano, siendo uno de los principales protagonistas en el ciclo doméstico de transmisión para *T. cruzi*, tomando en cuenta los hábitos domiciliarios de los vectores más abundantes en Querétaro para este parásito. De esta manera se podrá conocer el panorama actual sobre *T. cruzi* en Querétaro, al detectarse la prevalencia de *T. cruzi* en perros e identificar la o las cepas existentes y finalmente, si los perros domésticos están participando en la transmisión de este parásito a los humanos y si es así, que zonas se encuentran con mayor riesgo de transmisión.

HIPÓTESIS

En la Zona Metropolitana de Querétaro se ha registrado previamente la presencia de *T. cruzi* en humanos, sin embargo, hasta el momento se desconoce la presencia y exposición a este parásito en otros hospederos o reservorios, en particular los perros, que, debido a su abundancia, movilidad y su contacto directo con los humanos y otros animales, pudieran servir como hospederos importantes para el ciclo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en la Zona Metropolitana de Querétaro. Por lo tanto, se espera que los perros estén presentando anticuerpos al parásito, lo que permitiría analizar la presencia de *T. cruzi* en sangre y determinar el linaje al que pertenece.

Por lo tanto, se espera que los perros se encuentren expuestos al parásito *Trypanosoma cruzi* y así, esto permitiría evaluar la presencia a este parásito y determinar si el linaje circulante en estos hospederos es el mismo. Además, para que los perros sean considerados hospederos, se esperaría que los vectores se pudieran presentar en la zona metropolitana de Querétaro.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es identificar la exposición y presencia de *Trypanosoma cruzi* en perros domésticos y conocer su potencial como uno de los hospederos principales en la Zona Metropolitana de Querétaro, teniendo como **objetivos particulares** A) determinar la seropositividad a *T. cruzi* en los perros de la Zona Metropolitana de Querétaro, posteriormente B) detectar molecularmente la positividad al parásito para comprobar la presencia del mismo y determinar el linaje al que pertenece y c) conocer la distribución potencial y la probabilidad de ocurrencia de vectores de *Trypanosoma cruzi* en la Zona Metropolitana de Querétaro para comparar las zonas donde hay perros positivos y las zonas donde pudieran existir triatóminos.

Referencias

Ávila, H., 2009. Periurbanización y espacios rurales en la periferia de las ciudades. *Estud. Agrar.* 41, 96–97. doi:[ISSN: 1138-9788]

Brown, E., 2008. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in Mammals of the United States. Dissertation.

Brown, E.L., Roellig, D.M., Gompper, M.E., Monello, R.J., Wenning, K.M., Gabriel, M.W., Yabsley, M.J., 2010. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* among eleven potential reservoir species from six states across the southern United States. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 10, 757–763.

Estrada-Franco, J.G., 2006. Human *Trypanosoma cruzi* Infection and Seropositivity in Dogs, Mexico-Volume 12, Number 4—April 2006-Emerging Infectious Disease journal-CDC.

Galaviz-Silva, L., Mercado-Hernández, R., Zárate-Ramos, J.J., Molina-Garza, Z.J., 2017. Prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en perros y pequeños mamíferos de Nuevo León, México. *Rev. Argent. Microbiol.* 49, 216–223. doi:10.1016/j.ram.2016.11.006

Gürtler, R.E., Cecere, M.C., Lauricella, M.A., Cardinal, M. V, Kitron, U., Cohen, J.E., 2007. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 134, 69–82.

Herrera, L., 2010. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Bol. Malariol. y Salud Ambient.* 50, 3–15. doi:10.1016/j.ft.2009.03.004

Jimenez-Coello, M., Poot-Cob, M., Ortega-Pacheco, A., Guzman-Marin, E., Ramos-Ligonio, A., Sauri-Arceo, C.H., Acosta-Viana, K.Y., 2008. American

trypanosomiasis in dogs from an urban and rural area of Yucatan, Mexico. Vector Borne Zoonotic Dis. 8, 755–761. doi:10.1089/vbz.2007.0224

Longoni, S.S., Marín, C., Sauri-Arceo, C.H., López-Céspedes, A., Rodríguez-Vivas, R.I., Villegas, N., Escobedo-Ortegón, J., Barrera-Pérez, M. a, Bolio-Gonzalez, M.E., Sánchez-Moreno, M., 2011. An iron-superoxide dismutase antigen-based serological screening of dogs indicates their potential role in the transmission of cutaneous leishmaniasis and trypanosomiasis in Yucatan, Mexico. Vector Borne Zoonotic Dis. 11, 815–821. doi:10.1089/vbz.2010.0125

López-Céspedes, Á., Villagrán, E., Briceño Álvarez, K., de Diego, J.A., Hernández-Montiel, H.L., Saldaña, C., Sánchez-Moreno, M., Marín, C., 2012. *Trypanosoma cruzi*: seroprevalence detection in suburban population of Santiago de Querétaro (Mexico). ScientificWorldJournal. 2012, 914129. doi:10.1100/2012/914129

Marín, C., Díaz, J.G., Irure Maiques, D., Ramírez-Macías, I., Rosales, M.J., Guitierrez-Sánchez, R., Cañas, R., Sánchez-Moreno, M., 2017. Antitrypanosomatid activity of flavonoid glycosides isolated from *Delphinium gracile*, *D. staphisagria*, *Consolida oliveriana* and from *Aconitum napellus* subsp. *Lusitanicum*. Phytochem. Lett. 19, 196–209. doi:10.1016/j.phytol.2016.12.010

Martín-Escolano, R., Aguilera-Venegas, B., Marín, C., Martín-Montes, Á., Martín-Escolano, J., Medina-Carmona, E., Arán, V.J., Sánchez-Moreno, M., 2018. Synthesis and Biological in vitro and in vivo Evaluation of 2-(5-Nitroindazol-1-yl)ethylamines and Related Compounds as Potential Therapeutic Alternatives for Chagas Disease. ChemMedChem 2104–2118. doi:10.1002/cmdc.201800512

Molyneux, D.H., Ashford, R.W., 1983. The biology of *Trypanosoma* and

Leishmania, parasites of man and domestic animals. London, UK; Taylor & Francis Ltd.

Moya, P.R., Paolasso, R.D., Blanco, S., Lapasset, M., Sanmartino, C., Basso, B., Moretti, E., Cura, D., 1985. Tratamiento De La Enfermedad De Chagas Con Nifurtimox Durante Los Primeros Meses De Vida. *Medicina (B. Aires)*. 45, 553–558.

OMS, 2010. Enfermedad de Chagas : control y eliminación. Rep. Ser. Geneva. 5.

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2010. Enfermedad de Chagas : control y eliminación. a63/17 1–5.

PNUMA, SEDESU, CONCyTEQ, 2008. GEO zona metropolitana Querétaro. Querétaro.

Portugal-García, C., García-Vázquez, Z., Monteón-Padilla, V., Chávez-López, V., Olamendi-Portugal, M., Ramos, C., 2011. Anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en humanos y perros y presencia del parásito en *Meccus pallidipennis* en la localidad de Puente Pantitlán, Morelos, México. *Rev. Biomed.* 22, 67–75.

Ramsey, J.M., Peterson, A.T., Carmona-castro, O., Moo-Ilanes, D.A., Nakazawa, Y., Butrick, M., Tun-ku, E., 2015. Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae : Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease 110, 339–352. doi:10.1590/0074-02760140404

Ruiz-Piña, H. a., Cruz-Reyes, A., 2002. The opossum *Didelphis virginiana* as a synanthropic reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 613–620. doi:10.1590/S0074-02762002000500003

Salazar-Schettino, P.M., De Haro-Arteaga, I., Jiménez-Martínez, J., 2014.

Dos nuevas localizaciones de transmisores de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Salud Publica Mex.* 25, 77–82.

Solís-Franco, R.R., Romo-Zapata, J.A., Martínez-Ibarra, J.A., 1997. Wild reservoirs infected by *Trypanosoma cruzi* in the ecological park "El Zapotal", Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 163–164.

Sosa-Jurado, F., Zumaquero-Ríos, J.L., Reyes, P.A., Cruz-García, A., Guzmán-Bracho, C., Monteón, V.M., 2004. Biotic and abiotic determinants of seroprevalence of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in Palmar de Bravo, Puebla, Mexico. *Salud Publica Mex.* 46, 39–48.

Tyler, K.M., Engman, D.M., 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 31, 472–481. doi:10.1016/S0020-7519(01)00153-9

Velasco-Castrejon, O., Valdespino, J.L., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Guzman-Bracho, C., Magos, C., Llausas, A., Gutierrez, G., Sepulveda, J., 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Publica Mex.* 34, 186–196.

Villagrán-Herrera, M.E., de Diego Cabrera, J.A., 2008. La enfermedad de Chagas en el Estado de Querétaro, México: aspectos sociosanitarios. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química.

Villagrán, M.E., Marín, C., Hurtado, A., Sánchez-Moreno, M., de Diego, J.A., 2008. Natural infection and distribution of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in the state of Querétaro, Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 833–838. doi:10.1016/j.trstmh.2008.05.005

Villagrán, M.E., Marín, C., Rodríguez-Gonzalez, I., De Diego, J. a., Sánchez-Moreno, M., 2005. Use of an iron superoxide dismutase excreted by *Trypanosoma*

cruzi in the diagnosis of chagas disease: Seroprevalence in rural zones of the state of Queretaro, Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 510–516.

Villagrán, M.E., Sánchez-Moreno, M., Marín, C., Uribe, M., de la Cruz, J.J., de Diego, J.A., 2009. Seroprevalence to *Trypanosoma cruzi* in rural communities of the state of Queretaro (Mexico): statistical evaluation of tests. *Clin. Biochem.* 42, 12–16.

Zamora-Ledesma, S., Hernández-Camacho, N., Villagrán-Herrera, M.E., Sánchez-Moreno, M., Concha-Valdez, F.G., Jones, R.W., Moreno-Pérez, M.A., Camacho-Macías, B., 2016. Presence of trypanosomatid antibodies in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) and domestic and feral dogs (*Canis lupus familiaris*) in Queretaro, Mexico. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 5, 25–30.

Zárate, L.G., Zárate, R.J., Tempelis, C.H., Goldsmith, R.S., 1980. The Biology and Behavior of *Triatoma Bbarberi* (Hemiptera: Reduviidae) in Mexico: I. Blood meal sources and infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Med. Entomol.* 17, 103–116.

1. SEROPOSITIVIDAD A *TRYPANOSOMA CRUZI* EN PERROS DE LA ZONA METROPOLITANA DE QUERÉTARO

1.1. Introducción

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la Tripanosomiasis Americana (Molyneux y Ashford, 1983). Esta enfermedad, transmitida por vector, se encuentra clasificada por la Organización Mundial de la Salud como “enfermedad tropical olvidada o desatendida” principalmente por presentarse en mayor proporción en zonas con poblaciones humanas de escasos recursos (Paredes et al., 2001; OMS, 2010; Vargas Martínez et al., 2011). Los humanos no son los únicos hospederos de estos parásitos, ya que en el ciclo biológico de *T. cruzi* participan una gran cantidad de mamíferos silvestres y domésticos, ya sea como reservorios o como hospederos, de los cuales, los perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) se consideran como hospederos de importancia epidemiológica, principalmente por su abundancia en el peridomicilio, su contacto directo con los humanos y el posible contacto con fauna silvestre infectada o con los vectores de este tripanosomátido (Arjona-Jiménez et al., 2012; Herrera, 2010; Longoni et al., 2011).

En México (Fig. 5), el registro de este parásito en perros domésticos se ha localizado principalmente hacia el sureste del País como es el caso de la Península de Yucatán, considerada como zona endémica para la Tripanosomiasis Americana (Dumonteil, 1999). En estudios recientes, *T. cruzi* ha sido registrado en el centro del país, en los estados de Puebla, Estado de México y Morelos (Alberto

Barbabosa-Pliego et al., 2011; Carrillo-Peraza et al., 2014; Z Garcia-Vazquez et al., 1995; Jiménez-Coello et al., 2015).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

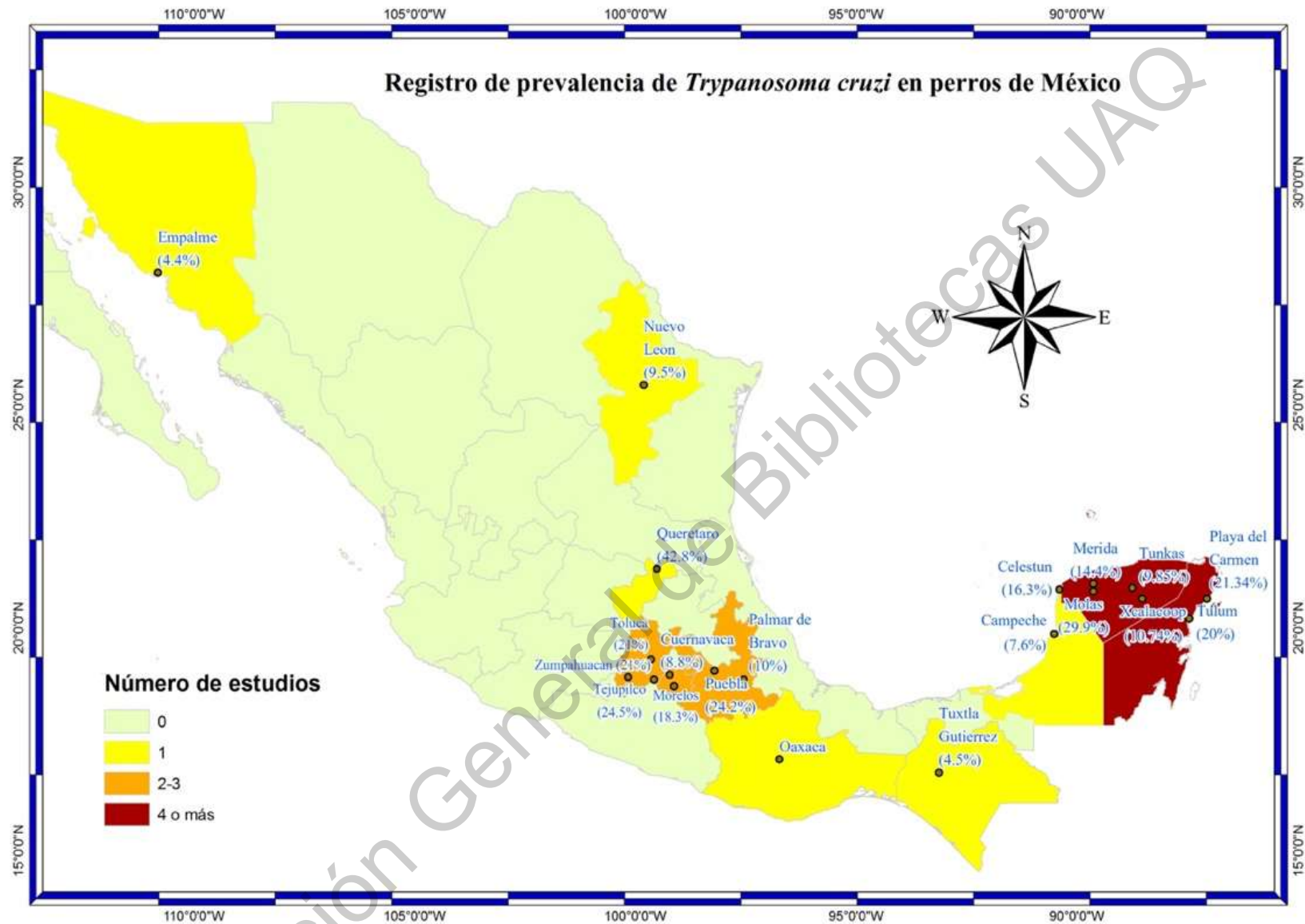


Fig. 5. Mapa de los registros de *T. cruzi* en perros de México. Los principales puntos de estudio para este parásito en la república mexicana son las zonas endémicas para la tripanosomiasis americana en humanos, entre ellos destaca la península de Yucatán (Zamora-Ledesma, 2018) .

En el estado de Querétaro existen registros de seropositividad en perros a estos parásitos, principalmente en comunidades rurales, algunas a 50 km de distancia de la capital del Estado (Villagrán-Herrera et al., 2018; Zamora-Ledesma et al., 2016). Por lo tanto, considerando el escenario anterior, se desconoce si los animales en la Zona Metropolitana de la ciudad de Querétaro hayan estado en contacto con los tripanosomátidos, considerando la alta movilidad de los perros domésticos, de la población humana al ser el estado de Querétaro zona de paso entre el norte y sur del país lo cual incrementa el riesgo de infección para la población humana residente de la región y por la posible presencia de los vectores, lo cual, sitúa al estado de Querétaro como uno de los estados del centro de México cuya población presenta el mayor riesgo de contraer Chagas actualmente (Carabarin-Lima et al., 2013). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la seropositividad a trypanosomátidos en perros callejeros y ferales de la Zona Metropolitana de Querétaro, que incluye a los municipios de Querétaro de Arteaga en donde se sitúa la capital de estado y del municipio de El Marqués.

1.2. Materiales y Métodos

1.2.1. Obtención de muestras de perros domésticos.

Las muestras sanguíneas de perros fueron donadas por los centros de Control Animal de los municipios de la zona metropolitana y de la capital del estado, con previo convenio de colaboración. Los centros de control animal que participaron en este proyecto son: Unidad de Control Animal del municipio de Querétaro (20.566380, -100.389382) y el Centro de Control Animal Municipal de El Marqués (20.640844, -100.249771). Se obtuvo una muestra sanguínea de 10 ml por punción en la vena cefálica, 5 ml será colocada en un tubo vacutainer sin anticoagulante (BD vacutainer®) para extraer suero sanguíneo.

1.2.2. Análisis serológico (ELISA indirecto y Western Blot) de las muestras de sangre.

ELISA. Para las pruebas ELISA se utilizó como antígeno en todos los casos una fracción parcialmente purificada de la enzima superóxido dismutasa de hierro excretada (FeSODe) de acuerdo a la técnica descrita por Marín et al., (2007). La fracción parcialmente purificada de la proteína (FeSODe) será revestida sobre placas de micro titulación de poliestireno (Nunc, Denmark) en tampón de carbonato (pH 8.2) por 24 h en cámara húmeda a 4 °C. Las placas fueron bloqueadas con Albúmina Sérica Bovina en 0.01 M de solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7,2) que contiene 0.05% de Tween 20 (Merck KGaA, Alemania).

Los anticuerpos acumulados en una dilución de suero de 1:100 en PBS fueron revelados con Inmunoglobulina G anti-perro (Fc specific) conjugado con peroxidasa (Sigma Immunochemical; dilución 1/1000). La reacción de la enzima se reveladó con el sustrato cromogénico O-fenilenediamina hidrógeno peróxido (Sigma Immunochemical) y 10 µl de H₂O₂ al 30% por 25 ml durante 30 min en oscuridad y bloqueadas con ácido clorhídrico 3 M (Fig. 5.). La absorbancia fue leída en lector de placas (Sunrise TM, TECAN) a 495nm. Todas las muestras se analizaron por triplicado en placas de microtitulación de poliestireno. La media y la desviación estándar (SD) de las densidad ópticas del control negativo (2 perros sanos) se utilizarán para calcular el valor de corte (media + 3x SD).

Análisis de Western Blot.

Las fracciones parcialmente purificadas de la proteína (FeSODe) de *T. cruzi* y de *L. mexicana* se corrieron en geles IEF 3-9 y posteriormente, fueron transferidos a nitrocelulosa durante 20 min (manual del Sistema Phast). La membrana se bloqueó por 24 h a 4°C usando gelatina a 0.4% y Tween 20 al 0.2% seguido de tres lavados en Tween 20 al 0.1% en PBS (PBS-T) y posteriormente se incubó por 2 h a temperatura ambiente con sueros de los hospederos en dilución de 1/100. Posteriormente, se lavó de nuevo por triplicado y la membrana se incubó adicionalmente durante 2 h con el anticuerpo secundario, inmunoglobulina G anti-perro (Fc specific) ligado a peroxidasa (Sigma Immunochemical; dilución 1/1000). Posterior al lavado, se añadió el sustrato diaminobenzidina (0.5mg/ml en tampón Tris/HCl 0.1 M, pH 7.4, conteniendo 1/5,000 H₂O₂ [10v/v]) y la reacción se detuvo con diversos lavados en agua destilada.

1.2.3. Análisis estadístico

Se hizo una prueba de distribución de proporción para determinar si el porcentaje de seropositividad obtenido se comporta como zona endémica o no endémica con una proporción hipotética de 17.55% y 8.36% respectivamente, obtenidos del promedio de registro de *T. cruzi* en perros de cada zona en México (Clopper and Pearson, 1934; Sokhal and Rohlf, 1970).

Asociación entre variables zona y condición

Para probar la asociación entre las variables zona (urbana, peri-urbana) y condición (negativos, positivos a *T. cruzi*, Positivos a *L. mexicana* y positivos a ambos) se utilizó una prueba de chi cuadrado (Everitt, 1992; Sokhal and Rohlf, 1970).

1.3. Resultados

1.3.1. Obtención de muestras

Perros. Del total de muestras obtenidas, se han analizado 303 sueros de perros procedentes de los CAM de la ZMQ, 177 muestras provienen del UCAM del municipio de Querétaro, mientras que 126 muestras provienen del CAAM del municipio de El Marqués.

1.3.2. Análisis serológico (ELISA indirecto)

Los análisis de las muestras de suero en el ensayo de ELISA utilizando la FeSODe como antígeno mostraron que 98 de 303 muestras fueron positivas para *Trypanosoma cruzi*. De las muestras que fueron positivas, 66 pertenecen al UCAM del municipio de Querétaro, y 32 al CAAM del municipio de El Marqués.

1.3.3. Análisis serológico (Western Blot)

Las muestras que obtuvieron resultado positivo mediante la prueba de ELISA utilizando la FeSODe como antígeno se analizaron mediante la técnica de Western Blot para confirmar su positividad (Fig. 8). De las 98 muestras positivas mediante ELISA, 31 muestras se confirmaron con seropositividad frente a *T. cruzi*. 16 muestras proceden del UCAM del municipio de Querétaro, mientras que las 15 restantes provienen del CAAM del municipio de El Marqués.

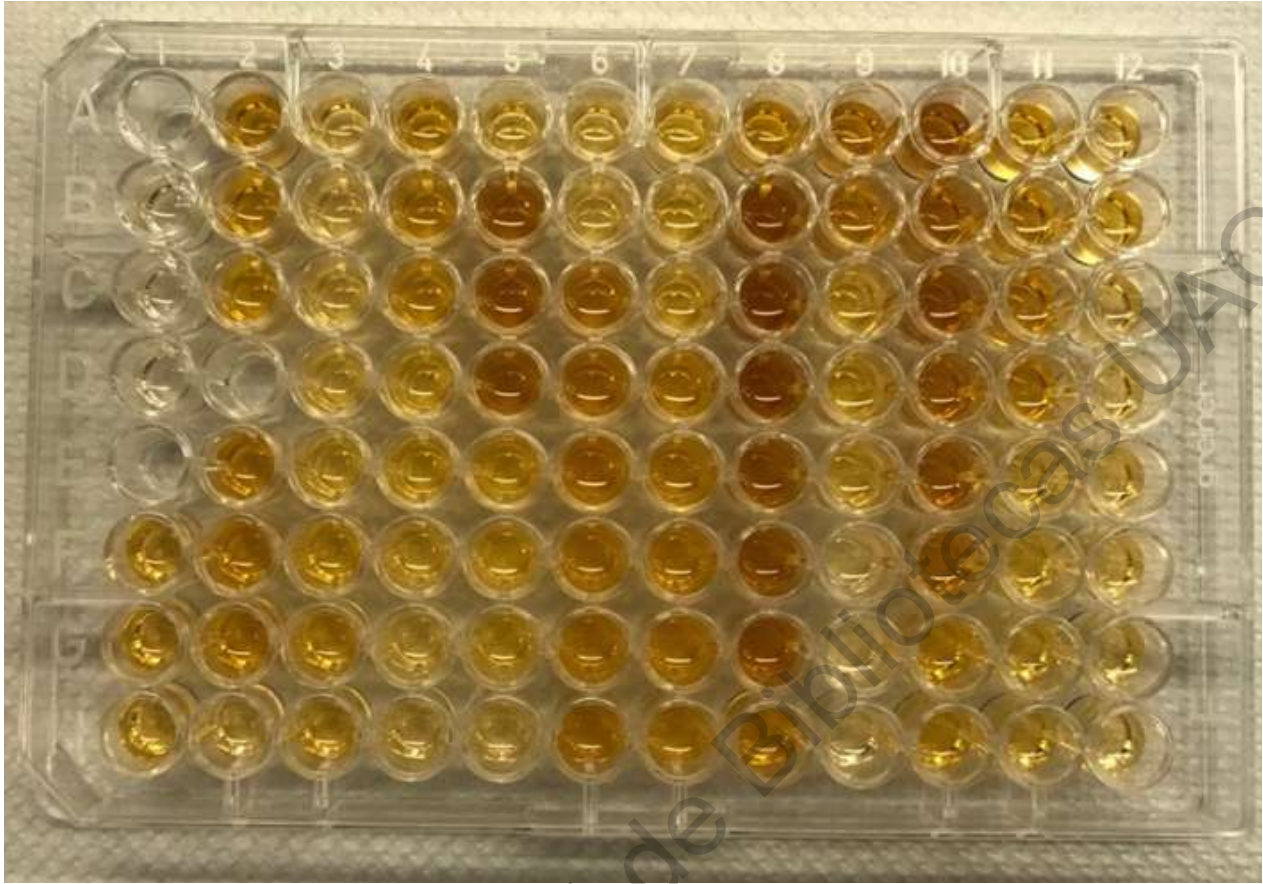


Fig. 6. Placa de ELISA con muestras de suero de perro positivas (color oscuro) y negativas (color claro) a *Trypanosoma cruzi*.

1.3.4. Análisis estadístico

Prueba de distribución de probabilidad. La proporción de seropositividad observada fue diferente a lo esperado de acuerdo a la hipótesis de zonas endémicas, y similar a lo esperado bajo la hipótesis de zonas no endémicas (Tabla 1)

Table 1. Prueba de comparación de proporciones.

Zonas endémicas		Zonas no endémicas	
Proporción observada	0.1023	Proporción observada	0.1023
N :	303	N :	303
95% conf. interval (normal):	(0.06818 0.1364)	95% conf. interval (normal):	(0.06818 0.1364)
Proporción hipotética:	0.1755	Proporción hipotética:	0.0836
Z :	-3.3496	Z :	1.176
p (same):	0.00080916	p (same):	0.23958

Asociación entre zona urbana y peri-urbana. La asociación entre las variables zona y condición no mostraron diferencias significativas en ningún valor, a excepción de los valores de co-infección que contribuyen significativamente a la asociación entre variables. (Tabla 2).

Tabla 2. Asociación de variables entre zona y condición

	Observado			
	Total negativos	Tc	Lm	Positivo a ambos
Urbano	159	16	1	0
Periurbano	108	11	4	4
Esperado				
Urbano	155.09	15.683	2.9043	2.3234
Periurbano	111.91	11.317	2.0957	1.6766
Residuales ajustados				
Urban	1.4073	0.12948	-1.7404	-2.3701*
Periurban	-1.4073	-0.12948	1.7404	2.3701*

Tc = Positivos a *T. cruzi*, Lm = Positivos a *L. mexicana*, * = categorías que contribuyeron significativamente a la asociación entre variables

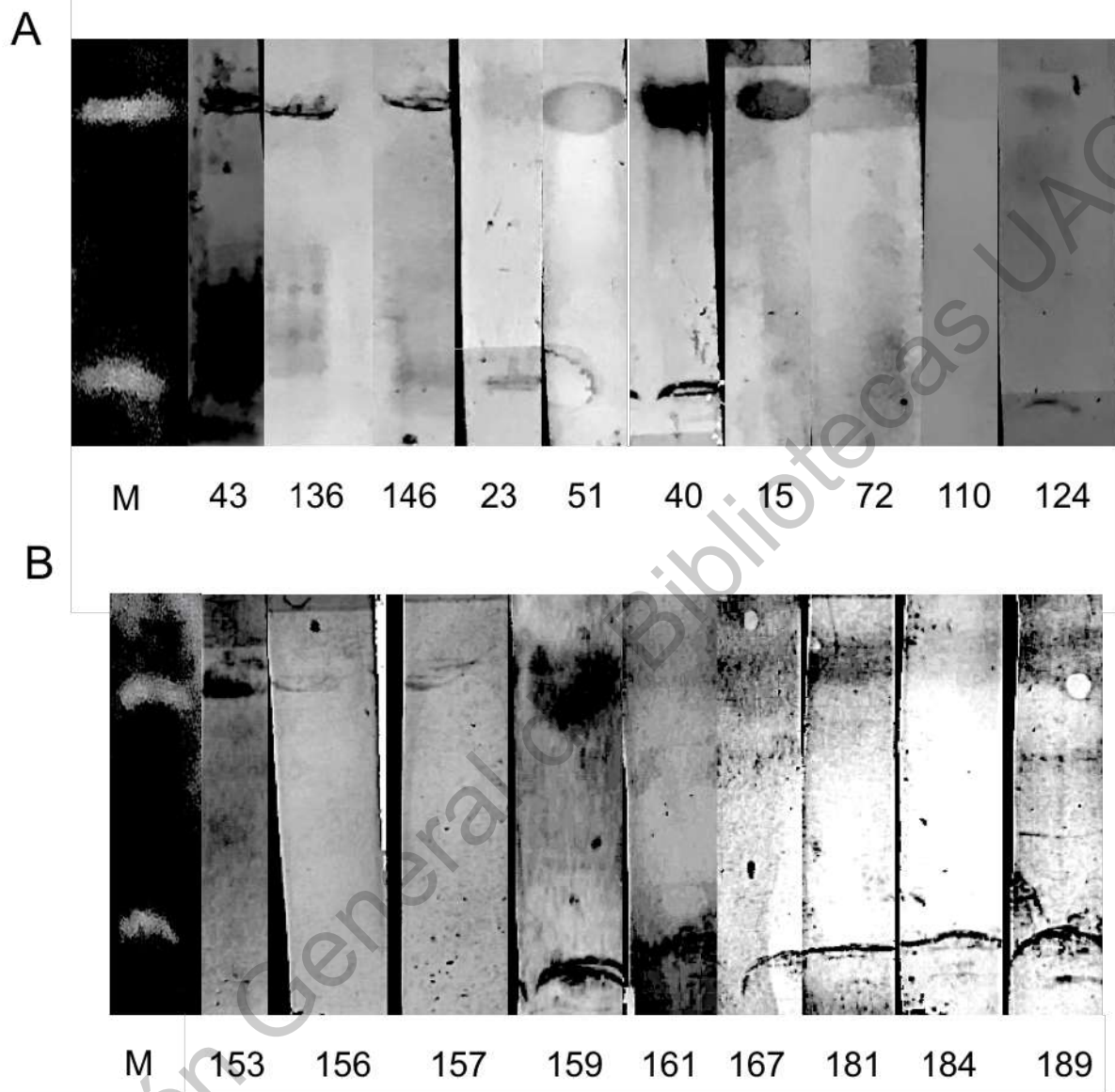


Fig. 7. Tiras de ensayo de Western Blot con muestras de suero de perro positivas (banda marcada) a *Trypanosoma cruzi*. M= Actividad de la FeSODe revelada de acuerdo a Beyer y Fridovich (1983) utilizado como marcador positivo (Zamora-Ledesma, 2020).

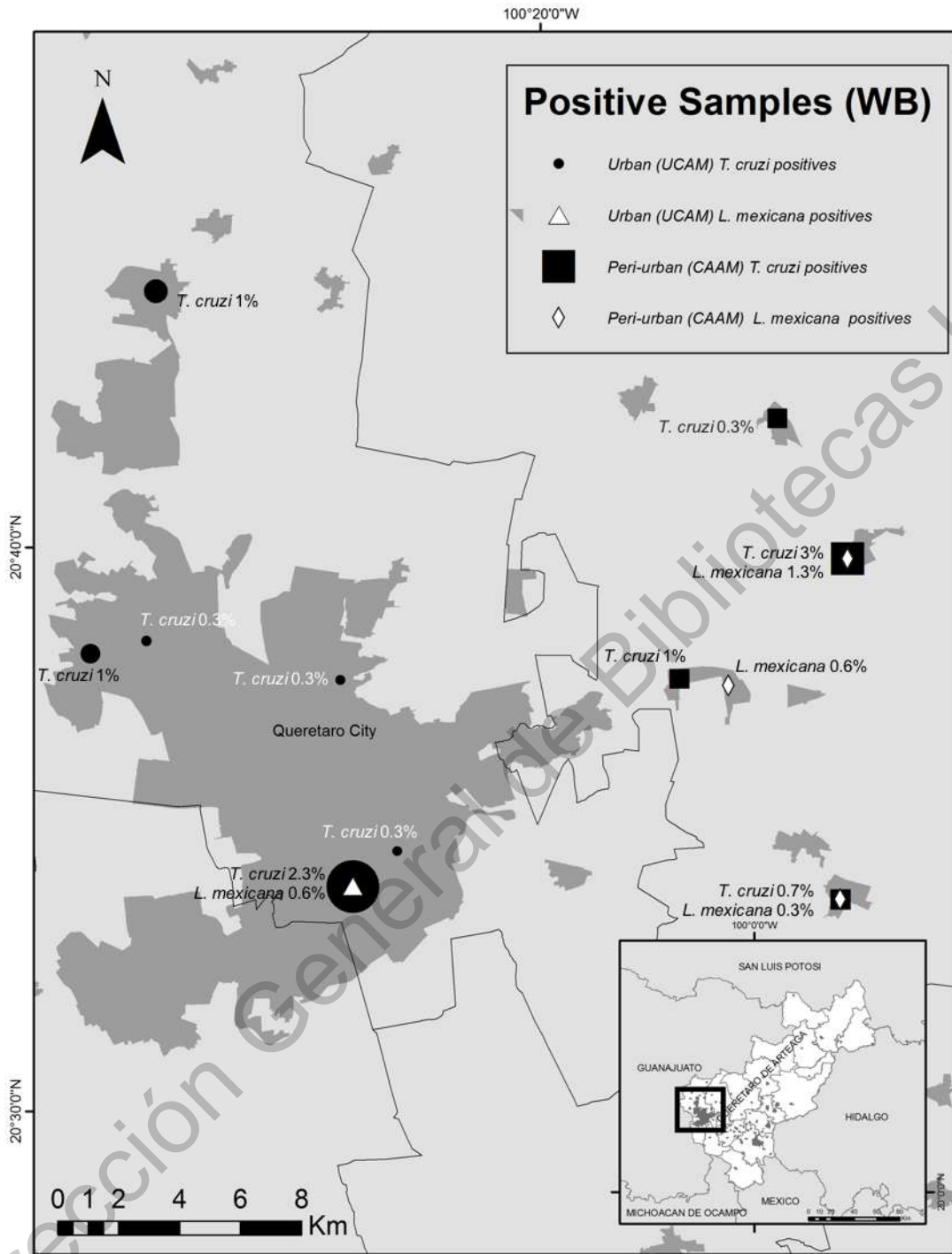


Fig. 8. Mapa de perros positivos (Western Blot) a *T. cruzi* y *L. mexicana* en la Zona Metropolitana de Querétaro. El porcentaje mostrado es de acuerdo al total de muestras obtenidas (303 muestras = 100%) (Zamora-Ledesma, 2020)

Tabla 2. Relación de las muestras de suero de perros de Querétaro y El Marqués, positivas a *Trypanosoma cruzi* mediante ensayos de ELISA y WB usando a Fe-SODe como antígeno

Clave	Procedencia	ELISA	WB	Clave	Procedencia	ELISA	WB	Clave	Procedencia	ELISA	WB
2	CAM QRO	Positivo	Negativo	48	CAM QRO	Positivo	Positivo	122	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
4	CAM QRO	Positivo	Negativo	50	CAM QRO	Positivo	Negativo	123	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
5	CAM QRO	Positivo	Positivo	51	CAM QRO	Positivo	Positivo	124	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
7	CAM QRO	Positivo	Negativo	62	CAM QRO	Positivo	Positivo	126	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
9	CAM QRO	Positivo	Positivo	72	CAM QRO	Positivo	Positivo	128	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
10	CAM QRO	Positivo	Negativo	74	CAM QRO	Positivo	Negativo	132	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
11	CAM QRO	Positivo	Positivo	77	CAM QRO	Positivo	Negativo	133	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
12	CAM QRO	Positivo	Negativo	78	CAM QRO	Positivo	Negativo	134	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
14	CAM QRO	Positivo	Negativo	86	CAM QRO	Positivo	Negativo	135	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
15	CAM QRO	Positivo	Positivo	87	CAM QRO	Positivo	Positivo	136	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
18	CAM QRO	Positivo	Negativo	88	CAM QRO	Positivo	Negativo	137	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
21	CAM QRO	Positivo	Negativo	89	CAM QRO	Positivo	Negativo	138	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
22	CAM QRO	Positivo	Negativo	90	CAM QRO	Positivo	Negativo	139	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
23	CAM QRO	Positivo	Positivo	91	CAM QRO	Positivo	Positivo	142	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
24	CAM QRO	Positivo	Negativo	92	CAM QRO	Positivo	Negativo	144	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
25	CAM QRO	Positivo	Negativo	93	CAM QRO	Positivo	Positivo	145	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
29	CAM QRO	Positivo	Negativo	95	CAM QRO	Positivo	Negativo	146	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
30	CAM QRO	Positivo	Negativo	97	CAM QRO	Positivo	Positivo	147	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
31	CAM QRO	Positivo	Negativo	98	CAM QRO	Positivo	Negativo	148	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
32	CAM QRO	Positivo	Negativo	100	CAM QRO	Positivo	Negativo	149	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
33	CAM QRO	Positivo	Negativo	101	CAM QRO	Positivo	Negativo	150	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
34	CAM QRO	Positivo	Negativo	102	CAM QRO	Positivo	Negativo	151	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
35	CAM QRO	Positivo	Negativo	107	CAM QRO	Positivo	Negativo	154	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
36	CAM QRO	Positivo	Negativo	109	CAM QRO	Positivo	Negativo	156	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
37	CAM QRO	Positivo	Negativo	110	CAM QRO	Positivo	Positivo	157	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
38	CAM QRO	Positivo	Negativo	111	CAM QRO	Positivo	Negativo	159	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
39	CAM QRO	Positivo	Negativo	112	CAM QRO	Positivo	Negativo	162	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
40	CAM QRO	Positivo	Positivo	114	CAM QRO	Positivo	Negativo	163	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
41	CAM QRO	Positivo	Negativo	115	CAM QRO	Positivo	Negativo	165	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Positivo
42	CAM QRO	Positivo	Negativo	116	CAM QRO	Positivo	Positivo	167	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
43	CAM QRO	Positivo	Positivo	117	CAM QRO	Positivo	Negativo	170	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo
44	CAM QRO	Positivo	Negativo	118	CAM QRO	Positivo	Negativo				
45	CAM QRO	Positivo	Negativo	120	CAM QRO	Positivo	Negativo				
47	CAM QRO	Positivo	Negativo	121	CAM EL MARQUÉS	Positivo	Negativo				

1.4. Conclusión

El diagnóstico serológico de trypanosomátidos es una herramienta útil para conocer la exposición a estos parásitos en ciertas zonas de interés. El uso de la FeSODe de trypanosomátidos como antígeno ha tenido resultados eficientes en las pruebas serológicas con humanos y perros, obteniendo valores altos de sensibilidad (99%) y especificidad (98%), lo que la convierte en un buen marcador (Marín et al., 2007, 2004). En este caso se registró por primera vez seropositividad a *Trypanosoma cruzi* y a *Leishmania mexicana* en perros de la Zona Metropolitana de Querétaro, el área más poblada del estado de Querétaro y zona de paso entre el norte y sur del país (PNUMA et al., 2008).

El análisis estadístico para los resultados obtenidos muestra que el porcentaje de seropositividad obtenido se considera similar a lo esperado en zonas que no son endémicas para *T. cruzi*, de acuerdo a lo encontrado en estados del centro de México (A. Barbabosa-Pliego et al., 2011; Z. Garcia-Vazquez et al., 1995; Quijano-Hernández et al., 2012; Sosa-Jurado et al., 2004). Por su parte, el resultado obtenido para *Leishmania mexicana* es importante debido a que se considera de los primeros registros de este parásito en el centro de México. Este hallazgo podría indicar la presencia de los vectores para ambos parásitos en la Zona Metropolitana de Querétaro, sobretodo para *Leishmania mexicana*, ya que la vía vectorial es la única forma de transmisión para este parásito. Sin embargo no se ha registrado ningún triatómino ni flebotómino en esta zona.

En este estudio se esperaba encontrar mayor proporción de muestras positivas para cada parásito en la zona periurbana en comparación a la zona urbana, debido a que las características del hábitat para los vectores son más parecidas a lo establecido en sitios similares (Ramsey et al., 2015), sin embargo, las pruebas estadísticas demuestran que no existe diferencia significativa entre ambas zonas y condiciones (a excepción de la condition of coinfection, sin embargo, se considera dentro de lo esperado) lo que resalta el registro de seropositividad en perros dentro del núcleo urbano de Querétaro, en donde es difícil imaginar la presencia de dichos vectores, sin embargo, la alta movilidad de los perros podría explicar este resultado (Arjona-Jiménez et al., 2012; Jiménez-Coello et al., 2015).

A pesar de que existen registros de los vectores (al menos para *T. cruzi*) en algunas partes del estado (Villagrán et al., 2008), la Zona Metropolitana de Querétaro carece de esta información, por lo que para asegurar si estos resultados positivos podrían presentar un factor de riesgo epidemiológico en la transmisión de dichos parásitos a los humanos, se requieren más evidencias que corroboren si el ciclo de vida de ambos trypanosomátidos se encuentra completo en esta zona. Para tener más información sobre el comportamiento de estos trypanosomátidos en la Zona Metropolitana de Querétaro, se recomienda llevar a cabo la búsqueda de los triatóminos y flebotóminos en las localidades que mostraron resultados positivos y verificar que presenten estos parásitos.

1.5. Referencias

Arjona-Jiménez, G., Villegas, N., López-céspedes, Á., Marín, C., Longoni, S.S., Bolio-gonzález, M.E., Rodríguez-vivas, R.I., Sauri-arceo, C.H., Sánchez-moreno, M., 2012. Prevalence of antibodies against three species of *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum*) and possible associated factors in dogs from Mérida, Yucatán, Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 252–258. doi:10.1016/j.trstmh.2011.12.003

Barbabosa-Pliego, A., Campos, P., Olivares, D., Aparicio-Burgos, J.E., Montes de Oca-Jiménez, R., Martínez-Castañeda, J.S., Ochoa-García, L., Guzmán-Bracho, C., Estrada-Franco, J.G., Jain, N., Vázquez, J.C., 2011. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* in dogs (*Canis familiaris*) and triatomines during 2008 in a Sanitary Region of the State of Mexico, Mexico. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11, 151–156. doi:10.1089/vbz.2009.0163

Barbabosa-Pliego, Alberto, Gil, P.C., Hernández, D.O., Aparicio-Burgos, J.E., de Oca-Jiménez, R.M., Martínez-Castañeda, J.S., Ochoa-García, L., Guzmán-Bracho, C., Estrada-Franco, J.G., Garg, N.J., 2011. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* in dogs (*Canis familiaris*) and triatomines during 2008 in a sanitary region of the State of Mexico, Mexico. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11, 151–156.

Carabarin-Lima, A., Gonzalez-Vazquez, M.C., Rodriguez-Morales, O., Baylon-Pacheco, L., Rosales-Encina, J.L., Reyes-Lopez, P.A., 2013. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Trop.* 127, 126–135. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.04.007

Carrillo-Peraza, J.R., Manrique-Saide, P., Rodríguez-Buenfil, J.C., Escobedo-Ortegón, J.F., Rodríguez-Vivas, R.I., Bolio-González, M.E., Barrera-Pérez, M., Reyes-Novelo, E., Sauri-Arceo, C.H., 2014. Serological study of *Trypanosoma cruzi* and associated factors in dogs from a rural community of Yucatan, Mexico . Arch. Med. Vet. 46, 75–81. doi:10.4067/S0301-732X2014000100011

Clopper, C.J., Pearson, E.S., 1934. The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the Case of the Binomial. Biometrika 26, 404. doi:10.2307/2331986

Dumonteil, E., 1999. Update on Chagas' disease in Mexico. Salud Publica Mex. 41, 322–327. doi:10.1590/S0036-36341999000400010

Everitt, B.S., 1992. The analysis of contingency tables. Chapman and Hall/CRC.

García-Vázquez, Z, Rosario-Cruz, R., Miranda-Miranda, E., Domínguez-Marquez, A., 1995. A serological survey of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs of two urban areas of Mexico. Prev. Vet. Med. 25, 1–6. doi:10.1016/0167-5877(95)00483-1

García-Vázquez, Z., Rosario-Cruz, R., Miranda-Miranda, E., Domínguez-Marquez, A., 1995. A serological survey of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs of two urban areas of Mexico. Prev. Vet. Med. 25, 1–6. doi:10.1016/0167-5877(95)00483-1

Herrera, L., 2010. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. Bol. Malariol. y Salud Ambient. 50, 3–15. doi:10.1016/j.ft.2009.03.004

Jiménez-Coello, M., Acosta-Viana, K., Guzmán-Marín, E., Bárcenas-Irabién, A., Ortega-Pacheco, A., 2015. American trypanosomiasis and associated risk

factors in owned dogs from the major city of Yucatan, Mexico. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 21, 37. doi:10.1186/s40409-015-0039-2

Longoni, S.S., Marín, C., Sauri-Arceo, C.H., López-Céspedes, A., Rodríguez-Vivas, R.I., Villegas, N., Escobedo-Ortegón, J., Barrera-Pérez, M. a, Bolio-Gonzalez, M.E., Sánchez-Moreno, M., 2011. An iron-superoxide dismutase antigen-based serological screening of dogs indicates their potential role in the transmission of cutaneous leishmaniasis and trypanosomiasis in Yucatan, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 815–821. doi:10.1089/vbz.2010.0125

Marín, C., Hitos, A.B., Rodríguez-González, I., Dollet, M., Sánchez-Moreno, M., 2004. *Phytomonas* iron superoxide dismutase: A possible molecular marker. *FEMS Microbiol. Lett.* 234, 69–74. doi:10.1016/j.femsle.2004.03.009

Marín, C., Longoni, S.S., Mateo, H., de Diego, J. a, Alunda, J.M., Minaya, G., Sánchez-Moreno, M., 2007. The use of an excreted superoxide dismutase in an ELISA and Western blotting for the diagnosis of *Leishmania (Leishmania infantum)* naturally infected dogs. *Parasitol. Res.* 101, 801–8. doi:10.1007/s00436-007-0551-6

Molyneux, D.H., Ashford, R.W., 1983. *The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals.* London, UK; Taylor & Francis Ltd.

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2010. *Enfermedad de Chagas : control y eliminación.* a63/17 1–5.

PNUMA, SEDESU, CONCyTEQ, 2008. *GEO zona metropolitana Querétaro.* Querétaro.

Quijano-Hernández, I.A., Castro-Barcena, A., Barbabosa-Pliego, A., Ochoa-

García, L., Del Ángel-Caraza, J., Vázquez-Chagoyán, J.C., 2012. Seroprevalence Survey of American Trypanosomiasis in Central Valley of Toluca. *Sci. World J.* 2012, 1–3. doi:10.1100/2012/450619

Ramsey, J.M., Peterson, A.T., Carmona-castro, O., Moo-llanes, D.A., Nakazawa, Y., Butrick, M., Tun-ku, E., 2015. Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae : Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease 110, 339–352. doi:10.1590/0074-02760140404

Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1970. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. *Syst. Zool.* 19, 391–393. doi:10.2307/2412280

Sosa-Jurado, F., Zumaquero-Ríos, J.L., Reyes, P.A., Cruz-García, A., Guzmán-Bracho, C., Monteón, V.M., 2004. Biotic and abiotic determinants of seroprevalence of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in Palmar de Bravo, Puebla, Mexico. *Salud Publica Mex.* 46, 39–48.

Villagrán-Herrera, M.E., Concha-Valdez, F.G., Sánchez-Moreno, M., de Diego Cabrera, J.A., Martínez-Ibarra, J.A., 2018. Coinfection of and *Leishmania* spp. in Synanthropic Reservoirs (*Canis familiaris*) in an Endemic Area of The State of Querétaro, Use of FeSODe as an Antigenic Tool. *J. Prev. Med.* 03, 1–7. doi:10.21767/2572-5483.100032

Villagrán, M.E., Marín, C., Hurtado, A., Sánchez-Moreno, M., de Diego, J.A., 2008. Natural infection and distribution of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in the state of Querétaro, Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 833–838. doi:10.1016/j.trstmh.2008.05.005

Zamora-Ledesma, S., Hernández-Camacho, N., Villagrán-Herrera, M.E., Sánchez-Moreno, M., Concha-Valdez, F.G., Jones, R.W., Moreno-Pérez, M.A.,

Camacho-Macías, B., 2016. Presence of trypanosomatid antibodies in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) and domestic and feral dogs (*Canis lupus familiaris*) in Queretaro, Mexico. Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports 5, 25–30.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

2. DETERMINACIÓN DE LINAJES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* PRESENTES EN EL CICLO DE TRANSMISIÓN DOMÉSTICO EN LA ZONA METROPOLITANA DE QUERÉTARO

2.1. Introducción

La taxonomía de *Trypanosoma cruzi* es compleja debido a diferentes factores de su ciclo de transmisión, considerando a esta especie como un conjunto de poblaciones y cepas circulantes en los hospederos, reservorios y vectores, ya sean domésticos o selváticos (Guzmán-Marín et al., 1999). Hay que tomar en cuenta que existe una diferencia en severidad de la tripanosomiasis tanto en humanos como en otros mamíferos, que se debe al pleomorfismo presentado por *T. cruzi* (Molyneux and Ashford, 1983; Tay et al., 1987). Debido a las diferentes interacciones entre las distintas especies de vectores y hospederos, *T. cruzi* ha sufrido cambios biológicos, bioquímicos y moleculares, dividiendo al parásito en diferentes linajes y cepas (Guzmán-Marín et al., 1999). Los distintos linajes y cepas han demostrado una variabilidad intraespecífica en diferencias morfológicas, virulencia, tropismo tisular, resistencia a los tratamientos químicos, y antígenos presentados (Brener, 1985). Se cree que estos cambios se deben a la interacción entre linajes selváticos y domésticos en diferentes grados de antropización (Wendel et al., 1992).

A partir de 1950 se comenzó con los estudios para la caracterización de las diferentes cepas de *T. cruzi*, diferenciándose en métodos biológicos, bioquímicos y

moleculares (Guzmán-Marín et al., 1999). Los métodos biológicos de caracterización se basan principalmente en el tropismo tisular que tiene el parásito en el hospedero. Por su parte, los métodos bioquímicos demuestran la diferencia enzimática para las cepas de *T. cruzi*. Actualmente los métodos moleculares son los más utilizados debido a que se detectan variaciones en el ADN del Kinetoplasto (Guzmán-Marín et al., 1999)

Linajes de *Trypanosoma cruzi*.

Las poblaciones de *Trypanosoma cruzi* se encuentran diferenciadas genéticamente en dos principales linajes, TcI, asociado al ambiente silvestre, y TcII, asociado a la transmisión doméstica (Souto et al., 1996) . Particularmente TcII se ha dividido en cinco subgrupos, dependiendo de los vectores y la localización geográfica en la que se presente (Brisse et al., 2001, 2000; Herrera, 2010)l. Aún así, se sigue reconociendo a los dos principales linajes para identificar el tipo de ciclo del que provienen la infección (Bosseno et al., 2009; Franco and Grimaldi, 1999; Souto et al., 1996). Sin embargo, en Querétaro se desconoce que linajes pudieran estar presentes, principalmente en el ciclo doméstico (Bosseno et al., 2002). Los perros domésticos pudieran servir como centinelas en el estudio de linajes de *Trypanosoma cruzi* debido a su alta abundancia, a su contacto directo con los humanos y a su alta movilidad, además de la facilidad para obtener muestras. En este estudio se espera encontrar la presencia del linaje TcII asociado a ambientes domésticos, sin embargo podría existir la posibilidad de que se presente TcI en los perros de zonas perirurbanas y rurales.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Obtención de muestras

Las muestras sanguíneas de perros fueron donadas por los centros de Control Animal de los municipios de la zona metropolitana y de la capital del estado, con previo convenio de colaboración. Los centros de control animal que participaron en este proyecto son: Unidad de Control Animal del municipio de Querétaro (20.566380, -100.389382) y el Centro de Control Animal Municipal de El Marqués (20.640844, -100.249771). Se obtuvo una muestra sanguínea de 10 ml por punción en la vena cefálica, 5 ml se colocaron en un tubo vacutainer sin anticoagulante (BD vacutainer®) y el resto (5 ml) en un tubo con EDTA como anticoagulante refrigerándose para su posterior procesamiento.

2.2.2. Presencia de *T. cruzi* en perros

Extracción de ADN. Para la extracción de ADN de las muestras de sangre se utilizó el protocolo del kit de la matriz Instagene (Bio-Rad). Se añadieron 10 mL de muestra sanguínea a 490 mL de agua desionizada en un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL. Se mezcló con vortex durante 10 segundos y se dejó incubar entre 15 y 20 minutos. Posteriormente se centrifugó el tubo a 10000 RPM por tres minutos. Se retiró cuidadosamente el todo sobrenadante dejando entre 20-30 mL sin remover el sedimento, al cual se le añadió 100 mL de la matriz de Instagene (en agitación magnética) y se incubó a 56 °C entre 15-30 minutos. Pasado este tiempo, se mezcló en el vortex a alta velocidad durante 10 segundos.

Posteriormente se colocó el tubo de la muestra en agua hirviendo a 100°C durante 8 minutos. Después de ese tiempo se pasó al vortex por 10 segundos y se centrifugó a 10000 RPM durante tres minutos. Del resultado se separaron 8 mL y 2 mL del sobrenadante para el diagnóstico molecular y la diferenciación de linajes por PCR convencional, respectivamente.

Diagnóstico molecular de presencia de *T. cruzi*. Las muestras de ADN de los perros fueron analizadas por PCR convencional para determinar la positividad a *T. cruzi* utilizando a la pareja de oligonucleótidos específicos que amplifican ADN del Kinetoplasto: Tc 121 (5'- AAA TAA TGT ACG GKG GAG ATG CAT GA - 3') y Tc 122 (5'- GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA - 3')

El protocolo de PCR convencional que se utilizó fue usando las siguientes condiciones: 8 mL ADN de las muestras de perros y triatominos. El volumen final de la reacción a 20 mL contendrá: 10 mL GoTaq Green Master Mix, 0.6 mL agua libre de nucleasas y 0.7 mL de cada oligo.

Las condiciones de amplificación propuestas fueron las siguientes: una temperatura inicial de desnaturalización a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización del ADN a 94°C por 50 seg, alineamiento de los oligos a 63.5°C por 50 seg, y elongación de la cadena a 72°C por 50 seg, y un periodo de elongación final a 72°C por 5 min. Los amplicones fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y observados en luz UV. Los productos de PCR de 330 pb están esperados para Tc121 y Tc122.

2.2.3. Linajes de *T.cruzi*

Las muestras que obtuvieron resultados positivos en el diagnóstico con los oligos Tc121 y Tc 122 fueron analizadas por PCR convencional para determinar el linaje al que pertenecen. Los oligonucleótidos que se utilizaron para determinar linaje fueron los sugeridos por Souto et. al., que amplifican una región intergénica del mini-exon: TC 1 (5' - GTG TCC GCC ACC TCC TTC GGG CC - 3'), TC 2 (5'- CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G - 3') y TcC (5' CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG - 3'). La mezcla de reacción fue 10 mL de GoTaq Green Master Mix, 1mL de cada oligo (Tc 1, Tc 2 y TcC), 1 mL de Dimetil Sulfoxido (DMSO) y 6 mL de ADN de la muestra. Las condiciones de amplificación en termociclador fueron las siguientes: una temperatura inicial de desnaturalización a 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización del ADN a 94°C por 30 seg, alineamiento de los oligos a 55°C por 30 seg, y elongación de la cadena a 72°C por 30 seg, y un periodo de elongación final a 72°C por 10 min. Se preparó un gel de agarosa al 2.5% con Bromuro de Etidio como revelador para separar los amplicones resultantes, los cuales dependen del linaje al que pertenecen, siendo 350 pb para Tc1 y 300 pb para Tc2.

2.3. Resultados

2.3.1. Positividad a *T. cruzi*

De las 303 muestras de sangre de perro, 18 de ellas obtuvieron resultado positivo al diagnóstico molecular con Tc 121 y Tc 122, 10 muestras pertenecientes a la UCAM y ocho al CAAM.

2.3.2. Linajes de *T. cruzi*

De las muestras que obtuvieron resultados positivos, 11 pertenecen al linaje TcII y cuatro al linaje TcI

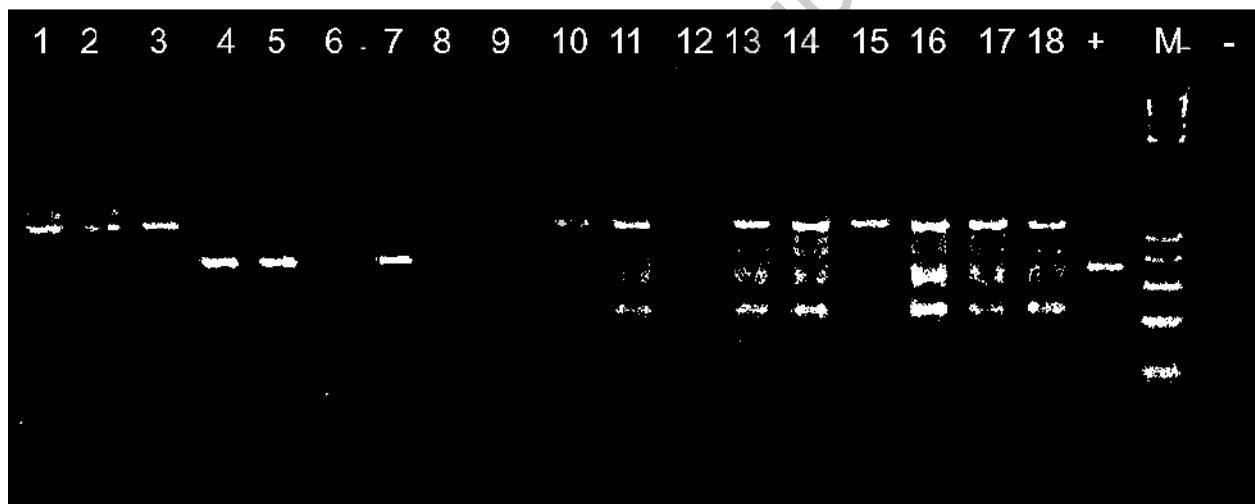


Fig. 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% para detectar los linajes TcI (350 pb) y TcII (300 pb). + es el control positivo, M es la escalera de 1Kb de pb,- es el control negativo (Zamora-Ledesma, 2018).

2.4. Conclusión

El diagnóstico molecular para *T. cruzi* nos ayuda a registrar la presencia del parásito en la muestra de sangre que queremos analizar, ya que los oligonucleótidos utilizados pertenecen directamente al organismo en cuestión. En este caso, las muestras de los 303 perros analizados registraron un 5.9% de positividad a la presencia del parásito, demostrando principalmente que *T. cruzi* si se puede encontrar en la Zona Metropolitana de Querétaro. Sin embargo, hasta el momento se desconoce el método de transmisión, ya que no se han registrado vectores para este parásito en esta zona. Es muy probable que en algunos sitios de la Zona Metropolitana de Querétaro, esta transmisión se pudiera estar dando por contacto con fauna silvestre infectada, ya que en otros estudios de nuestro grupo se ha registrado la presencia de este parásito en mamíferos carnívoros de localidades del municipio de El Marqués (Amazcala y Zibatá). Si bien, este diagnóstico es importante, también nos interesa conocer el linaje al que pertenece dicho parásito, ya que nos ayuda a identificar la posible ruta por la que se produjo la infección. Para *T. cruzi* se tienen bien diferenciados dos ciclos de transmisión (Selvático y domiciliar/peridomiciliar), en los que se han encontrado diferencias (morfológicas, biológicas y moleculares) en los organismos de *T. cruzi*. Estas diferencias lograron concentrar a *T. cruzi* en dos grandes grupos: TcI y TcII. Conociendo el linaje al que pertenece la muestra, se puede conocer de donde pudo venir la transmisión y así poder llevar a cabo teorías y entender mejor el ciclo biológico de *T. cruzi*. En este caso, el resultado fue interesante, ya que se registraron ambos linajes en las muestras de los perros obtenidos. Esto nos puede

indicar dos cosas, un escenario en el que el ciclo doméstico/peridoméstico existe y se pudiera encontrar completo, faltando por encontrar y registrar los vectores, y otro escenario en el que la transmisión se pudiera llevar a cabo por la vía trófica, es decir, *T. cruzi* proviene de un ambiente silvestre y se está pasando hasta los perros por depredación o contacto con fauna silvestre infectada por este parásito y de este linaje. Pero al presentarse ambos linajes en nuestras muestras, nos pudiera estar indicando que sería posible que ambos escenarios se estuvieran presentando en la Zona Metropolitana de Querétaro. Finalmente no se puede concluir si uno o ambos escenarios se están presentando debido a la falta de registros de vectores, tanto de especies domiciliarias como de especies silvestres. Para reforzar este trabajo es importante llevar a cabo un estudio entomológico en forma, tanto en la zona urbana como en la zona periurbana y rural, con el fin de buscar y encontrar estos vectores, ya sean especies domésticas y silvestres. Recientemente se encontró un ejemplar de *Triatoma barberi* en la zona urbana de Querétaro, dando indicios de la posibilidad de registrar el ciclo completo de transmisión en la Zona Metropolitana de Querétaro

2.5. Referencias

- Bosseno, M.-F., Barnabé, C., Gastélum, E.M., Kasten, F.L., Ramsey, J., Espinoza, B., Brenière, S.F., 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 40, 627–632.
- Bosseno, M.-F., Barnabé, C., Sierra, M.J.R., Kengne, P., Guerrero, S., Lozano, F., Ezequiel, K., Gastélum, M., Brenière, S.F., 2009. Wild ecotopes and food habits of *Triatoma longipennis* infected by *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 988–991.
- Brener, Z., 1985. General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* 18, 1–8.
- Brisse, S., Dujardin, J.-C., Tibayrenc, M., 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 95–105.
- Brisse, S., Verhoef, J., Tibayrenc, M., 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int. J. Parasitol.* 31, 1218–1226.
doi:10.1016/S0020-7519(01)00238-7
- Franco, A.M.R., Grimaldi, G., 1999. Characterization of Endotrypanum (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a Unique Parasite Infecting the Neotropical Tree Sloths (Edentata). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 261–268.
doi:10.1590/S0074-02761999000200026
- Guzmán-Marín, E., Zabala-Castro, J.E., Acosta-Viana, K.Y., Rosado-Barrera, M.E., 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma*. *Rev Biomed* 10, 177–184.
- Herrera, L., 2010. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Bol. Malariol. y Salud Ambient.* 50, 3–15.
doi:10.1016/j.ft.2009.03.004

Molyneux, D.H., Ashford, R.W., 1983. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. London, UK; Taylor & Francis Ltd.

Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A., Zingales, B., 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 141–152. doi:10.1016/S0166-6851(96)02755-7

Tay, J., Salazar Schettino, P.M., Ontiveros, A., Jiménez, J., Haro Arteaga, I. de, García Yanez, Y., Gutiérrez Quiroz, M., 1987. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en una población de Oaxaca, México.

Wendel, S., Brener, Z., Camargo, M.E., Rassi, A., 1992. Chagas disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine, in: *Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*. ISBT Brazil'92.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

3. DISTRIBUCIÓN POTENCIAL DE TRIATÓMINOS EN EL ESTADO DE QUERÉTARO

3.1. Introducción

La enfermedad de Chagas, o Tripanosomiasis americana, es causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* (Molyneux and Ashford, 1983). Este parásito se transmite principalmente por la vía vectorial, que en este caso son hemípteros de la familia Reduviidae, específicamente de la subfamilia Triatominae (Molyneux y Ashford, 1983). En México se encuentran registradas 31 especies de triatóminos, de las cuales, 19 especies son de hábitos domiciliarios (Ramsey et al., 2015). Para el estado de Querétaro se encuentran registradas cuatro especies del género *Triatoma*, siendo estas *Triatoma dimidiata*, *Triatoma mexicana*, *Triatoma pallidipennis* y *Triatoma gerstaeckeri* (Villagrán et al., 2008).

El modelaje de la distribución potencial de las especies es una herramienta útil para conocer donde se podrían encontrar registros de diversos organismos (López-Cárdenas et al., 2005; Torres Olave, 2019). En este caso, modelar la distribución potencial del género *Triatoma* nos podría indicar en donde se están encontrando los vectores para la enfermedad de Chagas, y donde llevar a cabo medidas de vigilancia y control epidemiológico para evitar un incremento en la prevalencia de esta enfermedad, además de que se encuentran registros de humanos con la enfermedad de Chagas en zonas rurales del Estado (Cruz-Chan

et al., 2009; Dumonteil and Gourbière, 2004; Jimenez-Coello et al., 2010; Villagrán et al., 2008).

Actualmente existen mapas de la distribución potencial de las 31 especies de triatóminos (Ramsey et al., 2015), incluyendo las especies registradas en Querétaro, sin embargo, la escala que se utiliza es a nivel país, y muchas de las bases de datos utilizadas en ese momento ya se encuentran desactualizadas. El objetivo de este estudio fue modelar la distribución potencial de dos especies de triatóminos (*T. barberi* y *T. mexicana*) en el estado de Querétaro, y conocer que sitios tienen mayor probabilidad de ocurrencia para estos vectores de *T. cruzi* en la zona metropolitana de Querétaro.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Distribución potencial

A partir de datos de presencia obtenidos de las bases de CONABIO y GBIF se trabajaron dos especies: *Triatoma mexicana* (101 registros) y *T. barberi* (6). Para la construcción del modelo se empleó el programa The Maxent (versión 3.3.3e) (Phillips et al., 2006; Phillips and Dudík, 2008). Se emplearon las 19 variables climáticas de la base de datos WordClim versión 2.0 (www.wordclim.org, consultada 06 de julio 2017). Descritas en el mismo sitio.

Estas variables climáticas fueron complementadas con topográficas tales como el modelo digital de la elevación, la pendiente, el aspecto y el índice topográfico de humedad (Sarkar et al., 2010) las últimas tres obtenidas a partir de la primera. Se llevó a cabo un primer modelamiento para descartar las variables ambientales topográficas con mínima o nula contribución en la construcción del modelo. Posteriormente, se llevó a cabo un segundo modelaje de 15 corridas sin las anteriores.

Para el modelamiento en el caso de *Triatoma mexicana* se utilizaron el 75% de los registros para generar el modelo y el restante para comprobarlo. Por otra parte, con *T. barberi*, todos los registros se emplearon en su construcción. La precisión de los modelos fue evaluada según Phillips et al. (2006), tomándose en cuenta el área debajo de la curva ROC/AUC, la cual es el mejor indicador. Toda la

información obtenida se trabajó con el programa ArcGis v. 10.(x) en formato Ascii Grid.

3.3. Resultados

3.3.1. Distribución potencial de *Triatóminos*

Los criterios para seleccionar registros fueron por encontrarse en fuentes confiables y por distribución dentro del Estado de Querétaro. De los 427 registros de *T. mexicana* en la base de datos, se seleccionaron 101, mientras que para *T. barberi*, de los 186 registros, únicamente se utilizaron seis.

El mapa resultante para *T. mexicana* indica una probabilidad Alta y Media-Alta de distribución para este vector en el centro del Estado, principalmente en la zona del Semidesierto (Figura 1. Mapa de distribución potencial de *Triatoma mexicana* en Querétaro.). Por su parte, el mapa resultante para *T. barberi* indica una probabilidad media a media-baja de que este vector se distribuya en el Estado de Querétaro, particularmente en el sur (Bajío) y centro del mismo (Semidesierto) (Figura 2. Mapa de distribución potencial de *Triatoma barberi* en Querétaro). De todas las variables bioclimáticas y topográficas utilizadas, las cinco más representativas para *T. mexicana* fueron: Precipitación estacional, Precipitación del trimestre más húmedo, Pendiente, Temperatura máxima del mes más frío y Precipitación del mes más húmedo (Tabla 1).

Para *T. barberi*, las cinco variables más representativas fueron: Pendiente, Isotermalidad, Precipitación del mes más húmedo, Rango de temperatura media diurna y Precipitación media diurna (Tabla 2).

Distribución potencial de *Triatoma mexicana* en Querétaro

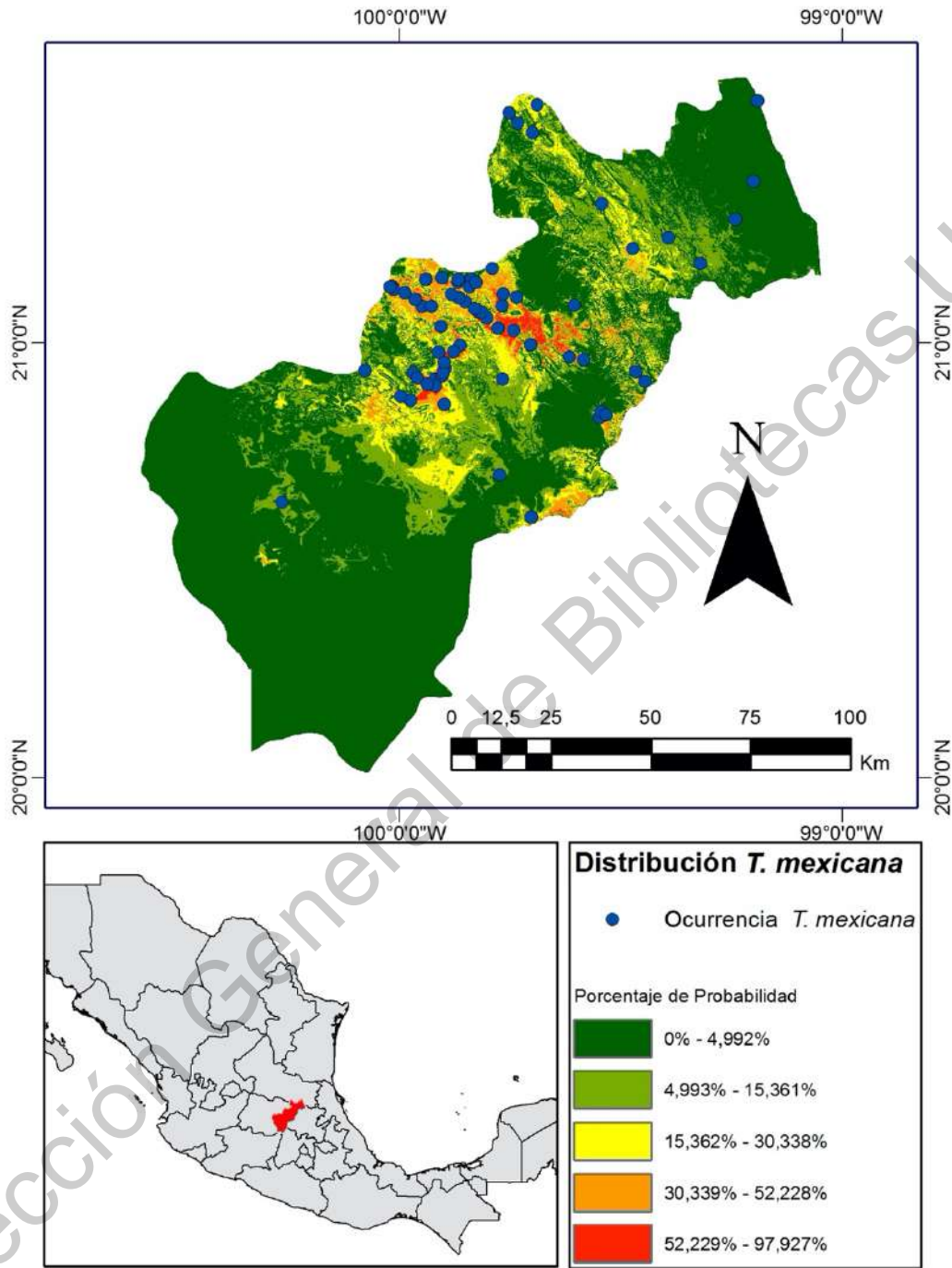


Fig. 10. Mapa de la distribución potencial de *Triatoma mexicana* para el estado de Querétaro, en colores cálidos se puede apreciar una mayor probabilidad de ocurrencia para este vector (Zamora-Ledesma, 2017).

Distribución potencial de *Triatoma barberi* en Querétaro

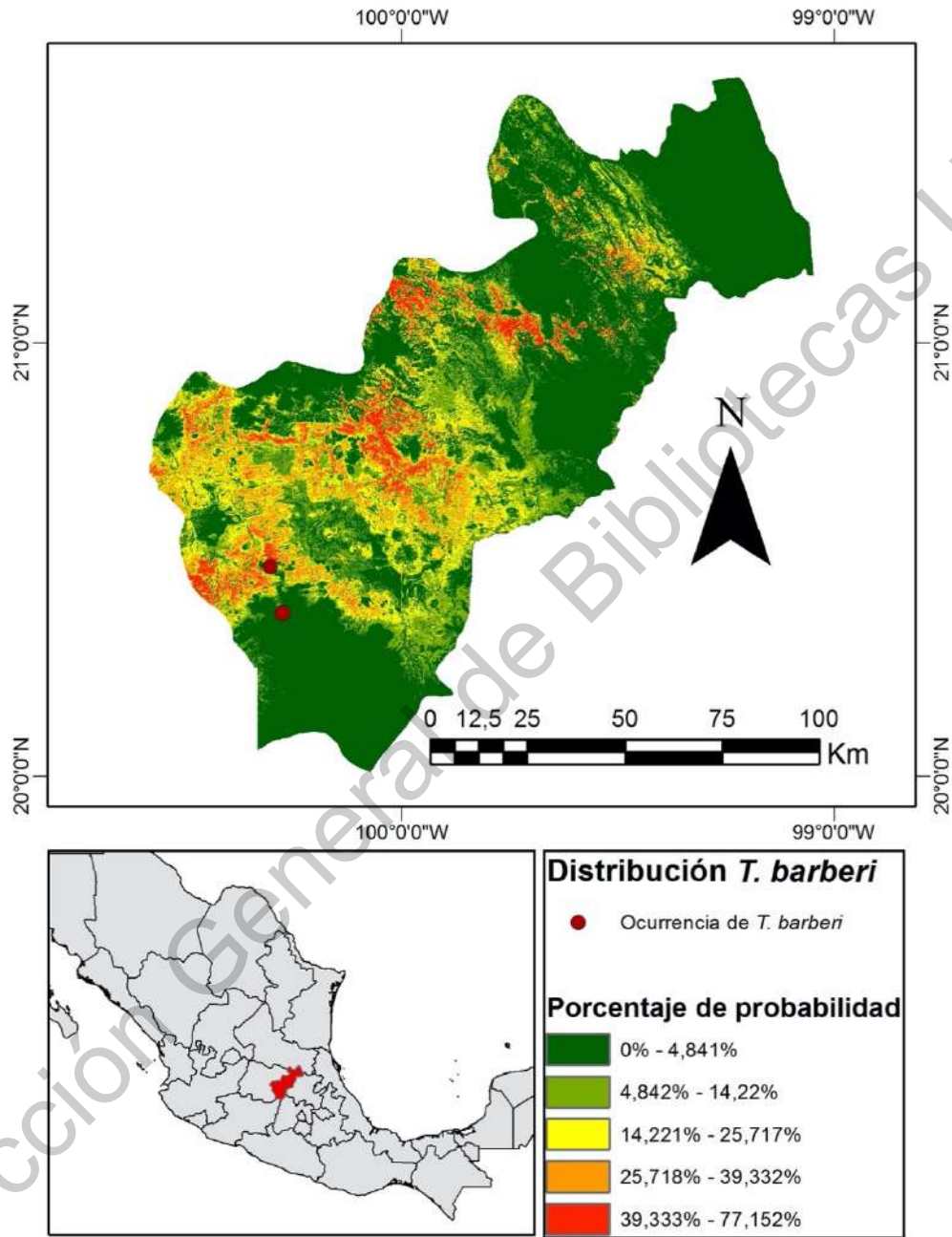


Fig. 11. Mapa de la distribución potencial de *Triatoma barberi* para el estado de Querétaro.

En colores cálidos (amarillo, naranja y rojo) se puede observar una mayor probabilidad de ocurrencia para esta especie de vector (Zamora-Ledesma, 2017).

Tabla 3. Variables climáticas y topográficas más representativas para *Triatoma mexicana*.

Se incluye su porcentaje de contribución y su importancia de permutación.

Variable	Porcentaje de contribución	Importancia de permutación
Precipitación estacional	21.3	5.6
Precipitación del trimestre más húmedo	19.9	1.2
Pendiente	13.6	24.3
Temperatura máxima del mes más frío	9.2	28.3
Precipitación del mes más húmedo	8.2	13
Modelo digital de Elevación	8.2	2.8
Isotermalidad	6.7	9.2
Rango de temperatura anual	4.1	0.8
Precipitación del mes más seco	2.6	3.9
Precipitación del trimestre más frío	2.4	4.2
Temperatura máxima del mes más caliente	1.7	4.2
Precipitación del cuarto más caliente	1.6	1.9
Precipitación anual	0.5	0.4

Tabla 4. Variables climáticas y topográficas más representativas para *Triatoma barberi*. Se incluye su porcentaje de contribución y su importancia de permutación.

Variable	Porcentaje de contribución	Importancia de permutación
Pendiente	18.6	19.8
Isotermalidad	16.8	1.3
Precipitación del mes más húmedo	12.5	4.6
Rango de temperatura media diurna	12.2	4.5
Precipitación del trimestre más seco	11.7	15.6
Precipitación del mes más seco	8	2.3
Precipitación estacional	5.6	3.2
Índice topográfico de humedad	5.6	0
Temperatura máxima del mes más frío	5.4	9.5
Rango de temperatura anual	2.3	22.7
Modelo digital de Elevación	1.2	16.6

3.4. Conclusión

El modelo de distribución potencial de *Triatoma mexicana* muestra una probabilidad alta y muy alta de ocurrencia de este vector de *Trypanosoma cruzi* para la zona del semidesierto queretano, influenciada principalmente por variables relacionadas con la precipitación y pendiente, es decir, *T. mexicana* se podría distribuir en zonas donde la pendiente es entre 10° y 20°, donde la precipitación del mes más húmedo, precipitación del trimestre más húmedo y la precipitación por estacionalidad también son bajas (100 a 200 mm al año), todas las anteriores, características del semidesierto. Para *Triatoma barberi*, el modelo de distribución potencial muestra una probabilidad del 14 al 77% de ocurrencia, principalmente en la zona del bajío queretano, en donde las características ambientales más representativas para que esta especie se distribuya son pendientes menores a 10°, la oscilación anual de temperatura es isotermal, la precipitación del mes más húmedo es baja y el rango de temperatura diurna es de 15 a 17 °C. Ambos modelos podrían demostrar que existe una distribución muy amplia para estas especies de triatóminos vectores de *Trypanosoma cruzi*, y aunque no existan muchos registros de los mismos, se podría relacionar con los casos de tripanosomiasis registrados en humanos en el Estado.

3.5. Referencias

Cruz-Chan, J.V., Bolio-González, M., Colín-Flores, R., Ramirez-Sierra, M.J., Quijano-Hernandez, I., Dumonteil, E., 2009. Immunopathology of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Vet. Parasitol.* 162, 151–155.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.024>

Dumonteil, E., Gourbière, S., 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. *Rev. Biomédica* 15, 221–231.

Jimenez-Coello, M., Guzman-Marin, E., Ortega-Pacheco, A., Acosta-Viana, K.Y., 2010. Serological survey of American trypanosomiasis in dogs and their owners from an urban area of Merida Yucatan, Mexico. *Transbound. Emerg. Dis.* 57, 33–36. doi:10.1111/j.1865-1682.2010.01130.x

López-Cárdenas, J., Gonzales, F., Salazar, P.M., Gallaga, J.C., Ramírez, E., Martínez, J., Sánchez-Cordero, V., Townsend, A., Ramsey, J., 2005. Fine-Scale Predictions of Distributions of Chagas Vectors in the State of Guanajuato, Mexico. *J. Med. Entomol.* 42, 1045–1056. doi:10.1603/0022-2585(2005)042

Molyneux, D.H., Ashford, R.W., 1983. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. London, UK; Taylor & Francis Ltd.

Phillips, S.J., Anderson, R.P., Schapire, R.E., 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol. Modell.* 190, 231–259.

Phillips, S.J., Dudík, M., 2008. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography (Cop.)*. 31, 161–175.

Ramsey, J.M., Peterson, A.T., Carmona-castro, O., Moo-llanes, D.A., Nakazawa, Y., Butrick, M., Tun-ku, E., 2015. Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae : Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease 110, 339–352. doi:10.1590/0074-02760140404

Sarkar, S., Strutz, S.E., Frank, D.M., Rivaldi, C.L., Sissel, B., 2010. Chagas Disease Risk in Texas 4. doi:10.1371/journal.pntd.0000836

Torres Olave, M.E., 2019. Factores biogeográficos-sociales que determinan la distribución de *Triatoma recurva* en Chihuahua, México, 2014. Inst. Arquitect. Diseño y Arte.

Villagrán, M.E., Marín, C., Hurtado, A., Sánchez-Moreno, M., de Diego, J.A., 2008. Natural infection and distribution of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in the state of Querétaro, Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 833–838. doi:10.1016/j.trstmh.2008.05.005

4. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS: INTERACCIÓN ENTRE PERROS Y TRIATÓMINOS EN LA ZONA METROPOLITANA DE QUERÉTARO

4.1. Introducción

La transmisión de una enfermedad vectorial involucra muchos factores, principalmente la interacción entre dichos vectores y los hospederos del parásito . En el caso de *T. cruzi*, esta dinámica es más compleja debido a la gran cantidad de hospederos y el grán número de especies de triatóminos que pueden servir como vector (Herrera, 2010; Molyneux and Ashford, 1983; Ramsey et al., 2015, 2012). Sin embargo, en México se conoce bien cuales son las especies más importantes que funcionan como vector en el ciclo doméstico y se tienen bien reconocidas las fuentes de alimentación principal para estos insectos (Brenière et al., 2004; Ramsey et al., 2015). Tal es el caso de *Triatoma barberi*, que se sabe que los perros forman parte importante de su alimentación, demostrando el contacto directo entre las chinches y estos animales (Zarate et al., 1980). Esta dinámica es muy importante para mantener el ciclo de transmisión de manera activa, ya que los perros están manteniendo al parásito en el ambiente para que otras chinches puedan tomar su sangre infectada y distribuir el parásito en nuevos hospederos (Aguilar-Garcia et al., 2010; Barr, 2009; López-Cespedes et al., 2013; Portugal-García et al., 2011). De esta manera, se ha utilizado a los perros como centinelas en el estudio de *Trypanosoma cruzi* en el ciclo doméstico (Galaviz-Silva et al., 2017; Martínez et al., 2014; Quijano-Hernández et al., 2012; Zamora-Ledesma et al., 2020). En países endémicos se ha visto relación entre la ausencia

de triatóminos y bajas prevalencias de *T. cruzi* en perros (Castañera et al., 1998; Montenegro et al., 2002; Rojas et al., 2008). Por ello, se ha utilizado la prevalencia de *T. cruzi* en estos animales para determinar la efectividad de los programas de control de triatóminos en ambientes domésticos (Burnham et al., 2017; Ruiz et al., 2011).

Sin embargo, se desconoce como pudiera estarse presentando esta dinámica en la Zona Metropolitana de Querétaro, por lo que es necesario evaluar, primero que nada, la co-existencia o solapamiento de distribución de vectores (*Triatoma barberi*) y hospederos (*Canis lupus familiaris*), sobretodo porque no existen registros formales de la presencia de *T. barberi* en Querétaro. Aún así, se tienen datos de perros positivos a *Trypanosoma cruzi* en la Zona Metropolitana de Querétaro, por lo que es importante revisar si coinciden con la distribución potencial para los vectores.

4.2. Materiales y métodos

Para llevar a cabo el mapa de solapamiento entre la distribución potencial de *T. barberi* y los perros positivos a *Trypanosoma cruzi*, se utilizó el programa ArcMap en versión 10.3. Como base se utilizaron los mapas previamente elaborados para el capítulo 3 (distribución potencial de *Triatoma barberi* en la Zona Metropolitana de Querétaro) y se le añadieron los puntos de los sitios donde fueron capturados los perros que resultaron positivos a *T. cruzi* en las pruebas de serología (datos de captura proporcionados por el CAAM y la UCAM). Debido a la movilidad de los perros, se les agregó una zona de buffer o de área de influencia de 5 Km.

4.3. Resultados

El mapa resultante mostró solapamiento entre nueve puntos donde se registró la captura de los perros que resultaron positivos a *Trypanosoma cruzi* en las zonas con una probabilidad media y media alta de presencia de *Triatoma barberi* en la Zona Metropolitana de Querétaro.

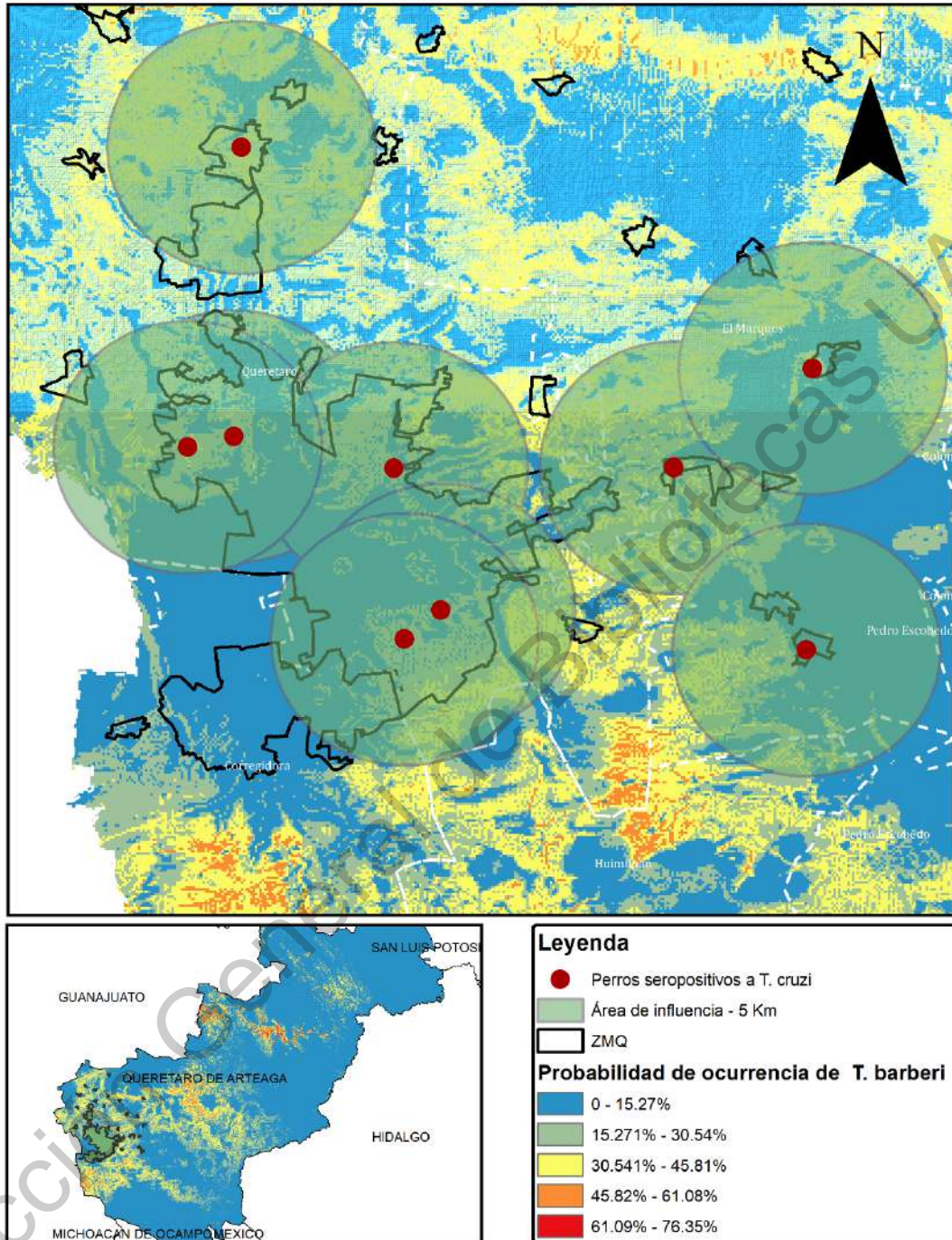


Fig. 12. Mapa de la interacción entre los puntos de captura de perros positivos a *T. cruzi* y la distribución potencial de *Triatoma barberi* en la Zona Metropolitana de Querétaro (Zamora-Ledesma, 2020).

4.4. Discusión y conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en los análisis de presencia de anticuerpos y de ADN de *T. cruzi* en perros, se encontró positividad en estos animales en colonias tanto del interior de la ciudad, como en localidades del área periurbana de la Zona Metropolitana de Querétaro, sin embargo, no existen registros de los vectores de este parásito en esta zona. Por lo anterior, es importante retomar que en los resultados del modelaje de distribución potencial de triatóminos en Querétaro se encontró cierta probabilidad de ocurrencia de *Triatoma barberi* en la Zona Metropolitana de Querétaro. Integrando estos resultados, se puede observar que los sitios en los que se capturaron los perros positivos a *T. cruzi* (además de considerar su rango de movilidad) están presentándose en áreas donde la probabilidad de ocurrencia de *T. barberi* es media a media alta (30% al 61%), lo que podría indicar cierta interacción entre hospederos y vectores de este parásito. Recientemente se registró un ejemplar de *T. barberi* para el interior de la Zona Metropolitana de Querétaro, en un punto donde una de las muestras obtuvo resultado positivo a ambas pruebas de diagnóstico, además de que en el mapa de distribución potencial, se tiene una probabilidad de ocurrencia media a media alta. La movilidad de los perros también juega un papel importante, ya que se tiene registrado que los perros callejeros en zonas urbanas de México puede tener un ámbito hogareño de cinco a 10 Km², dependiendo de la densidad poblacional y las vías de comunicación. Como se ha mencionado anteriormente, es necesario que se lleve a cabo un estudio entomológico completo para buscar la presencia de estos insectos, ya que los resultados obtenidos en este estudio son parte de las evidencias que demuestran

la presencia del ciclo completo de *T. cruzi* en la Zona Metropolitana de Querétaro. Por lo anterior, en caso de encontrar triatóminos en la Zona Metropolitana de Querétaro, es muy factible que se pueda utilizar a los perros como centinelas en el estudio de *Trypanosoma cruzi* en Querétaro, debido a su abundancia, movilidad, el posible contacto con los triatóminos y la facilidad de obtención de muestras por los factores anteriores.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

4.5. Referencias

- Aguilar-Garcia, J.J., Dominguez-Pérez, A.D., Nacarino-Mejías, V., Iribarren-Marín, M.A., 2010. Enfermedad de Chagas. Rev. Clin. Esp. 210, 224.
doi:10.1016/j.rce.2010.02.005
- Barr, S.C., 2009. Canine Chagas' Disease (American Trypanosomiasis) in North America. Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract. 39, 1055–1064.
doi:10.1016/j.cvsm.2009.06.004
- Brenière, S.F., Pietrokovsky, S., Gastélum, E.M., Bosseno, M.-F., Soto, M.M., Ouaisi, A., Kasten, F.L., Wisnivesky-Colli, C., 2004. Feeding patterns of *Triatoma longipennis* Usinger (Hemiptera, Reduviidae) in peridomestic habitats of a rural community in Jalisco State, Mexico. J. Med. Entomol. 41, 1015–1020. doi:10.1603/0022-2585-41.6.1015
- Burnham, E.R., Shinkarenko, L., Peralta, R.D.C., Zalamea, B.B., 2017. *Trypanosoma cruzi* en el perro doméstico, reservorio de la enfermedad de Chagas, en áreas norte y sur de la ciudad Pedro Carbo. RECIMUNDO Rev. Científica la Investig. y el Conoc. 1, 213–234.
- Castañera, M.B., Lauricella, M.A., Chuit, R., Gürtler, R.E., 1998. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. Ann. Trop. Med. Parasitol. 92, 671–683.
- Galaviz-Silva, L., Mercado-Hernández, R., Zárate-Ramos, J.J., Molina-Garza, Z.J., 2017. Prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en perros y pequeños mamíferos de Nuevo León, México. Rev. Argent. Microbiol. 49, 216–223. doi:10.1016/j.ram.2016.11.006
- Herrera, L., 2010. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. Bol. Malariol. y Salud Ambient. 50, 3–15.
doi:10.1016/j.ft.2009.03.004
- López-Céspedes, A., Longoni, S.S., Sauri-Arceo, C.H., Rodríguez-Vivas, R.I.,

Villegas, N., Escobedo-Ortegón, J., Barrera-Pérez, M. a, Sánchez-Moreno, M., Bolio González, M.E., Marín, C., 2013. Seroprevalence of antibodies against the excreted antigen superoxide dismutase by *Trypanosoma cruzi* in dogs from the Yucatan Peninsula (Mexico). *Zoonoses Public Health* 60, 277–83. doi:10.1111/j.1863-2378.2012.01520.x

Martínez, I., Martínez-Ibarra, A., Arce-Fonseca, M., Rodríguez-Morales, O., Pérez-Morales, D., Reyes López, P.A., Espinoza, B., 2014. Seroprevalence and major antigens recognized by sera from *Trypanosoma cruzi* infected dogs from Jalisco, México. *Rev. Argent. Microbiol.* 46, 85–90. doi:10.1016/s0325-7541(14)70053-7

Molyneux, D.H., Ashford, R.W., 1983. *The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals.* London, UK; Taylor & Francis Ltd.

Montenegro, V.M., Jiménez, M., Dias, J.C., Zeledón, R., 2002. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 491–494.

Portugal-García, C., García-Vázquez, Z., Monteón-Padilla, V., Chávez-López, V., Olamendi-Portugal, M., Ramos, C., 2011. Anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en humanos y perros y presencia del parásito en *Meccus pallidipennis* en la localidad de Puente Pantitlán, Morelos, México. *Rev. Biomed.* 22, 67–75.

Quijano-Hernández, I.A., Castro-Barcena, A., Barbabosa-Pliego, A., Ochoa-García, L., Del Ángel-Caraza, J., Vázquez-Chagoyán, J.C., 2012. Seroprevalence Survey of American Trypanosomiasis in Central Valley of Toluca. *Sci. World J.* 2012, 1–3. doi:10.1100/2012/450619

Ramsey, J.M., Gutiérrez-Cabrera, A.E., Salgado-Ramírez, L., Peterson, A.T., Sánchez-Cordero, V., Ibarra-Cerdeña, C.N., 2012. Ecological Connectivity of *Trypanosoma cruzi* Reservoirs and *Triatoma pallidipennis* Hosts in an Anthropogenic Landscape with Endemic Chagas Disease. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0046013

Ramsey, J.M., Peterson, A.T., Carmona-castro, O., Moo-Ilanes, D.A., Nakazawa, Y., Butrick, M., Tun-ku, E., 2015. Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae : Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease 110, 339–352. doi:10.1590/0074-02760140404

Rojas, M.E., Várquez, P., Villarreal, M.F., Velandia, C., Vergara, L., Morán-Borges, Y.H., Ontiveros, J., Yelitza Calderón, M., Chiurillo-Siervo, M.Á., Rodríguez-Bonfante, C. del C., 2008. Estudio seroepidemiológico y entomológico sobre la enfermedad de Chagas en un área infestada por *Triatoma maculata* (Erichson 1848) en el centro-occidente de Venezuela. Cad. Saude Publica 24, 2323–2333.

Ruiz, A., Salazar, P.M., Rojas, G., Guevara, Y., Torres, E., Gutiérrez, M., Ruiz, L., Prichi, I., Flores, M., 2011. Enfermedad de Chagas. Biomédica 31, 23–205.

Zamora-Ledesma, S., Hernández-Camacho, N., Sánchez-Moreno, M., Ruiz-Piña, H., Villagrán-Herrera, M.E., Marín-Sánchez, C., Carrillo-Angeles, I.G., Jones, R.W., Camacho-Macías, B., 2020. Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana* in dogs from a metropolitan region of Central Mexico. Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports 22, 100459.

Zarate, L.G., Zarate, R.J., Tempelis, C.H., Goldsmith, R.S., 1980. The biology and behavior of *Triatoma barberi* (Hemiptera: Reduviidae) in Mexico. I. Blood meal sources and infection with *Trypanosoma cruzi*. J. Med. Entomol. 17, 103–116. doi:10.1093/jmedent/17.2.103

5. ANEXO

Publicación indizada: “Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana* in dogs from a metropolitan region of Central Mexico”

Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports 22 (2020) 100459



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vprsr



Original Article

Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana* in dogs from a metropolitan region of Central Mexico



S. Zamora-Ledesma^a, N. Hernández-Camacho^{a,*}, M. Sánchez-Moreno^b, H. Ruiz-Piña^c, M.E. Villagrán-Herrera^d, C. Marín-Sánchez^b, I.G. Carrillo-Angeles^a, R.W. Jones^a, B. Camacho-Macias^a

^aAcademic Group in Ecology and Faunal Diversity, Department of Natural Sciences, Autonomous University of Querétaro, Mexico

^bMolecular Parasitology Laboratory, Faculty of Sciences, Universidad de Granada, Spain

^cAcademic Group for Ecological and Geographical Surveillance of Zoonosis in the Yucatan Peninsula, Autonomous University of Yucatán, Mexico

^dDepartment of Biomedical Research, School of Medicine, Autonomous University of Querétaro, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Trypanosomatids
Dogs
Metropolitan zone of Querétaro
Mexico temperate zones

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi and *Leishmania mexicana* are parasites of humans and other mammals, causing American Trypanosomiasis and Cutaneous Leishmaniasis, respectively. Domestic dogs are considered key hosts for these parasites in the domicile and peridomicile cycles of transmission, due to their abundance and contact with human population. In Mexico, there are few studies that involve the study of infection with these parasites in dogs, and have only been carried out mainly in the endemic areas for these diseases. In the state of Querétaro (Mexico), infections with both parasites have been reported for dogs only from rural areas, with no records for the metropolitan zone.

We analyzed the seropositivity to *T. cruzi* and *L. mexicana* in dogs from localities within of the metropolitan zone of Querétaro City in order to determine if these animals are exposed to these parasites and thus, could be an important part of the transmission cycle of these trypanosomatids in a densely populated urban region within the state of Querétaro, Mexico.

Serum samples were collected from 303 dogs housed in the Animal Control centers of the municipalities of Querétaro and El Marques, analyzed by indirect ELISA and Western Blot using as an antigen the Iron Superoxide Dismutase (FeSODe) of the parasites.

From the total serum samples, we detected 10.2% of seropositivity for *T. cruzi* and 2.9% for *L. mexicana*. Our results represent the first evidence of infection with *T. cruzi* in domestic dogs from the Metropolitan Zone of Querétaro, and the first record for *L. mexicana* in Central Mexico. Ongoing investigations seek to confirm the circulation of these parasites in the area to evaluate the risk associated to the human population.

1. Introduction

Trypanosoma cruzi and *Leishmania mexicana* are the causative agents of American Trypanosomiasis (Chagas disease) and Cutaneous Leishmaniasis, respectively (Molyneux and Ashford, 1983). Both vector-borne diseases are classified by the World Health Organization as “neglected tropical diseases” due to the fact that they occur primarily in human populations with limited resources (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2010; Paredes et al., 2001; Vargas Martínez et al., 2011). A large number of wild and domestic mammals participate as hosts in the transmission cycles of *T. cruzi* and *L. mexicana* (Molyneux and Ashford, 1983). Domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) are

considered hosts of epidemiological importance, which is primarily due to their abundance in the peridomiciliary environment, their direct contact with humans, and their contact with infected wild hosts or with vectors of these trypanosomatids (Arjona-Jiménez et al., 2012; Herrera, 2010; Longoni et al., 2011).

Studies on trypanosomatids in dogs from México have been carried out mainly in the area of southeastern México, which is considered an endemic region for American trypanosomiasis and cutaneous leishmaniasis (Balan et al., 2011; Cruz-Chan et al., 2009; Jiménez-Coello et al., 2015, 2010a, 2010b, 2008; Longoni et al., 2011; López-Céspedes et al., 2012). However, there are records of *T. cruzi* and *L. mexicana* in dogs from the center and north of the country (Arce-Fonseca et al., 2017;

* Corresponding author at: Av.de las Ciencias S/N, Juriquilla, Querétaro 76230, México.
E-mail address: norma.hernandez@uaq.mx (N. Hernández-Camacho).

<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100459>

Received 10 March 2020; Received in revised form 5 August 2020; Accepted 26 August 2020

Available online 30 August 2020

2405-9390/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Barbabosa-Pliego et al., 2009; Estrada-Franco et al., 2006; Galaviz-Silva et al., 2017; García-Vázquez et al., 1995, 1995; Salazar-Schettino et al., 1997; Sosa-Jurado et al., 2004). An endemic area for metaxenic diseases is defined as one where the disease occurs constantly and where the vectors are present to complete the active transmission cycle, whereas in a non-endemic area, transmission occurs through other routes, like blood transfusion or organ transplant (Molyneux and Ashford, 1983). However, the abundance of the vectors must be considered, since it is not the same an area where vectors proliferate as another where the occurrence is scarce, so that the areas that could be considered as non-endemic could have the presence of vectors but smaller scale than an endemic area (Ramsey et al., 2015). In non-endemic areas from México, the average Chagas positivity is 8.3% (Arce-Fonseca et al., 2017; Barbabosa-Pliego et al., 2009; Estrada-Franco et al., 2006; Galaviz-Silva et al., 2017; García-Vázquez et al., 1995, 1995; Quijano-Hernández et al., 2012; Sosa-Jurado et al., 2004; Villagrán-Herrera et al., 2018; Zamora-Ledesma et al., 2016), while for endemic areas, the average is 15.8% (Arjona et al., 2017; Balan et al., 2011; Carrillo-Peraza et al., 2014; Cruz-Chan et al., 2009; García-Vázquez et al., 1995, 1995; Jiménez-Coello et al., 2010a; Jiménez-Coello et al., 2015, 2008; Longoni et al., 2011; López-Céspedes et al., 2013; Mejía et al., 2017a; Ortega-Pacheco et al., 2017; Salazar-Schettino et al., 1997). Most of these studies have demonstrated exposure to these parasites using various serological tests. For the state of Querétaro there are seropositivity records to these parasites in which FeSODE was used as an antigen, however they are limited to rural areas of the state. Currently, there is no information for the region of the Bajío queretano where the metropolitan zone of Querétaro City is situated.

It has been shown that the use of FeSODE has high sensitivity and specificity in the serological diagnosis of trypanosomatids, not only in humans, but also in dogs, making it a good tool to detect exposure to these parasites (López-Céspedes et al., 2013; Marín et al., 2004; Marín and Sánchez-Moreno, 2009). The objective of this study was to serologically diagnose *T. cruzi* and *L. mexicana* in stray dogs from the Metropolitan Zone of Querétaro using FeSODE as antigen, in order to determine if these animals are exposed to these parasites and thus, could be an important part of the transmission cycle of these trypanosomatids in a densely populated urban and periurban region within the state of Querétaro, Mexico. Furthermore, it is unknown in what category of endemicity the city of Querétaro is for both diseases, however it is expected that the results will be similar to a non-endemic area, due to the vector abundance is not as noticeable as in endemic areas. In addition, because the type of habitat within the urban area would not be as favorable for the vector species that could occur in Querétaro, it would be expected to find a higher proportion of seropositivity for both parasites in dogs in the peri-urban area, where the habitat is more similar to that recorded for these vector species (Ramsey et al., 2015).

2. Materials and methods

2.1. Serum samples from dogs

The calculation of sample size to estimate a proportion of successes (Daniel, 1999) was carried out with the formula:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

where *N* (population size) = 6000 dogs caught per year on average, by the animal control centers of Querétaro (Benítez, 2018), *Z*_α (standard deviation corresponding to 95% confidence level) = 1.96, *p* (success probability expected) = 0.158 or 0.084 which was obtained as the average positivity of *T. cruzi* in dogs from Mexico in endemic or non-endemic areas respectively (Arce-Fonseca et al., 2017; Estrada-Franco et al., 2006; Galaviz-Silva et al., 2017; García-Vázquez et al., 1995,

1995; Mejía et al., 2017b; Quijano-Hernández et al., 2012; Sosa-Jurado et al., 2004), *q* = 1 - *p*, *d* (maximum sampling error) = 0.05. Selection criteria of the study data that were used to obtain the means of each area were that in each of them there were more than 50 animals in the sample, that the diagnostic test used was reliable, ruling out all those that presented only HAI. To differentiate whether the studies used were in an endemic or non-endemic area, it was taken into account if the authors mentioned it or if few or no vector registries were found in the area. The sample size calculated was of 214 for endemic areas and 115 for non-endemic areas.

Blood samples from stray dogs were donated by Animal Control Centers (ACC's) from the metropolitan zone municipalities and the capital city, through a collaboration agreement with the Autonomous University of Querétaro (UAQ). The ACC's that participated in this project were the Municipal Animal Control Unit of Querétaro (urban zone), and the Municipal Animal Control Center of El Marqués (peri-urban zone). The climate in municipalities is semi dry with summer rains, and average temperatures (18 °C) slightly lower than those of the lowlands (Bajío), while the dominant vegetation is xeric shrub-lands and small areas of relatively altered deciduous tropical forest (PNUMA et al., 2008). Five milliliters of blood were obtained by specialized personnel of ACC's through puncture in the cephalic vein; the blood was placed in a Vacutainer tube without anticoagulant (BD vacutainer®) to obtain serum. We don't have demographic information about the dogs (age, breed, sex) because the samples were donated.

2.2. Parasite culture

Parasite cultures were carried out (promastigotes) of *L. mexicana* (MHQM/BZ/82/Bel21), and epimastigotes of *T. cruzi* (MHOM/ME/2006/H-4) in an axenic medium for trypanosomes liquid (MTL) (Gibco, USA), supplementing with fetal bovine serum (Sigma, USA) at 10% and inactivated at 56 °C.

2.3. Extraction and purification of the SOD excreted as antigen (Fe-SODE)

Parasite forms in the exponential growth phase were concentrated by centrifugation at 1500 rpm for 10 min, the cell pellet was washed twice in serum-free MTL medium, then the number of cells was counted in an hemocytometric chamber, and the cells were distributed into aliquots of 5 × 10⁹ parasites/mL. Subsequently, the parasites were again grown in serum-free MTL medium for 24 h, the supernatant was collected by centrifugation at 1500 rpm for 10 min and then passed through a filter of 0.45-mm pore size, and solid ammonium sulfate was added. The protein fraction, which precipitated at a salt concentration of between 35%–85%, was centrifuged (9000 rpm for 20 min at 48 °C), re-dissolved in 2.5 mL of 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) containing 1 mM EDTA (buffer 2), and dialyzed on a Sephadex G-25 column (Pharmacia, PD 10) previously balanced with buffer 2, to give a final volume of 2.5 mL (Fe-SODE fraction) (Marín et al., 2004).

2.4. Serological analysis of blood samples (indirect ELISA and Western Blot)

2.4.1. Indirect ELISA

For the ELISA tests, a partially purified fraction of excreted iron superoxide dismutase (FeSODE) was used as the antigen in all cases (López-Céspedes et al., 2013; Marín et al., 2007). The partially purified fraction of the protein (FeSODE) was coated onto polystyrene microtiter plates (Nunc, Denmark) in carbonate buffer (pH 8.2) and incubated for 24 h in a humidity chamber at 4 °C. The plates were blocked with bovine serum albumin in 0.01 M phosphate buffered saline solution (PBS; pH 7.2) containing 0.05% Tween 20 (Merck KGaA, Germany).

The antibodies contained in a serum dilution of 1:100 in PBS were revealed with peroxidase-conjugated anti-dog immunoglobulin G (Thermo Fisher Scientific Cat# A18763, RRID:AB_2535540; dilution

Barbabosa-Pliego et al., 2009; Estrada-Franco et al., 2006; Galaviz-Silva et al., 2017; García-Vázquez et al., 1995, 1995; Salazar-Schettino et al., 1997; Sosa-Jurado et al., 2004). An endemic area for metaxenic diseases is defined as one where the disease occurs constantly and where the vectors are present to complete the active transmission cycle, whereas in a non-endemic area, transmission occurs through other routes, like blood transfusion or organ transplant (Molyneux and Ashford, 1983). However, the abundance of the vectors must be considered, since it is not the same an area where vectors proliferate as another where the occurrence is scarce, so that the areas that could be considered as non-endemic could have the presence of vectors but smaller scale than an endemic area (Ramsey et al., 2015). In non-endemic areas from México, the average Chagas positivity is 8.3% (Arce-Fonseca et al., 2017; Barbabosa-Pliego et al., 2009; Estrada-Franco et al., 2006; Galaviz-Silva et al., 2017; García-Vázquez et al., 1995, 1995; Quijano-Hernández et al., 2012; Sosa-Jurado et al., 2004; Villagrán-Herrera et al., 2018; Zamora-Ledesma et al., 2016), while for endemic areas, the average is 15.8% (Arjona et al., 2017; Balan et al., 2011; Carrillo-Peraza et al., 2014; Cruz-Chan et al., 2009; García-Vázquez et al., 1995, 1995; Jiménez-Coello et al., 2010a; Jiménez-Coello et al., 2015, 2008; Longoni et al., 2011; López-Céspedes et al., 2013; Mejía et al., 2017a; Ortega-Pacheco et al., 2017; Salazar-Schettino et al., 1997). Most of these studies have demonstrated exposure to these parasites using various serological tests. For the state of Querétaro there are seropositivity records to these parasites in which FeSODe was used as an antigen, however they are limited to rural areas of the state. Currently, there is no information for the region of the Bajío queretano where the metropolitan zone of Querétaro City is situated.

It has been shown that the use of FeSODe has high sensitivity and specificity in the serological diagnosis of trypanosomatids, not only in humans, but also in dogs, making it a good tool to detect exposure to these parasites (López-Céspedes et al., 2013; Marín et al., 2004; Marín and Sánchez-Moreno, 2009). The objective of this study was to serologically diagnose *T. cruzi* and *L. mexicana* in stray dogs from the Metropolitan Zone of Querétaro using FeSODe as antigen, in order to determine if these animals are exposed to these parasites and thus, could be an important part of the transmission cycle of these trypanosomatids in a densely populated urban and periurban region within the state of Querétaro, Mexico. Furthermore, it is unknown in what category of endemicity the city of Querétaro is for both diseases, however it is expected that the results will be similar to a non-endemic area, due to the vector abundance is not as noticeable as in endemic areas. In addition, because the type of habitat within the urban area would not be as favorable for the vector species that could occur in Querétaro, it would be expected to find a higher proportion of seropositivity for both parasites in dogs in the peri-urban area, where the habitat is more similar to that recorded for these vector species (Ramsey et al., 2015).

2. Materials and methods

2.1. Serum samples from dogs

The calculation of sample size to estimate a proportion of successes (Daniel, 1999) was carried out with the formula:

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

where N (population size) = 6000 dogs caught per year on average, by the animal control centers of Querétaro (Benítez, 2018), Z_{α} (standard deviation corresponding to 95% confidence level) = 1.96, p (success probability expected) = 0.158 or 0.084 which was obtained as the average positivity of *T. cruzi* in dogs from Mexico in endemic or non-endemic areas respectively (Arce-Fonseca et al., 2017; Estrada-Franco et al., 2006; Galaviz-Silva et al., 2017; García-Vázquez et al., 1995,

1995; Mejía et al., 2017b; Quijano-Hernández et al., 2012; Sosa-Jurado et al., 2004), $q = 1 - p$, d (maximum sampling error) = 0.05. Selection criteria of the study data that were used to obtain the means of each area were that in each of them there were more than 50 animals in the sample, that the diagnostic test used was reliable, ruling out all those that presented only HAI. To differentiate whether the studies used were in an endemic or non-endemic area, it was taken into account if the authors mentioned it or if few or no vector registries were found in the area. The sample size calculated was of 214 for endemic areas and 115 for non-endemic areas.

Blood samples from stray dogs were donated by Animal Control Centers (ACC's) from the metropolitan zone municipalities and the capital city, through a collaboration agreement with the Autonomous University of Querétaro (UAQ). The ACC's that participated in this project were the Municipal Animal Control Unit of Querétaro (urban zone), and the Municipal Animal Control Center of El Marqués (peri-urban zone). The climate in municipalities is semi dry with summer rains, and average temperatures (18 °C) slightly lower than those of the lowlands (Bajío), while the dominant vegetation is xeric shrub-lands and small areas of relatively altered deciduous tropical forest (PNUMA et al., 2008). Five milliliters of blood were obtained by specialized personnel of ACC's through puncture in the cephalic vein; the blood was placed in a Vacutainer tube without anticoagulant (BD vacutainer®) to obtain serum. We don't have demographic information about the dogs (age, breed, sex) because the samples were donated.

2.2. Parasite culture

Parasite cultures were carried out (promastigotes) of *L. mexicana* (MHOM/BZ/82/Be121), and epimastigotes of *T. cruzi* (MHOM/ME/2006/H-4) in an axenic medium for trypanosomes liquid (MTL) (Gibco, USA), supplementing with fetal bovine serum (Sigma, USA) at 10% and inactivated at 56 °C.

2.3. Extraction and purification of the SOD excreted as antigen (Fe-SODe)

Parasite forms in the exponential growth phase were concentrated by centrifugation at 1500 rpm for 10 min, the cell pellet was washed twice in serum-free MTL medium, then the number of cells was counted in an hemocytometric chamber, and the cells were distributed into aliquots of 5×10^9 parasites/mL. Subsequently, the parasites were again grown in serum-free MTL medium for 24 h, the supernatant was collected by centrifugation at 1500 rpm for 10 min and then passed through a filter of 0.45- μ m pore size, and solid ammonium sulfate was added. The protein fraction, which precipitated at a salt concentration of between 35%–85%, was centrifuged (9000 rpm for 20 min at 48 °C), re-dissolved in 2.5 mL of 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) containing 1 mM EDTA (buffer 2), and dialyzed on a Sephadex G-25 column (Pharmacia, PD 10) previously balanced with buffer 2, to give a final volume of 2.5 mL (Fe-SODe fraction) (Marín et al., 2004).

2.4. Serological analysis of blood samples (indirect ELISA and Western Blot)

2.4.1. Indirect ELISA

For the ELISA tests, a partially purified fraction of excreted iron superoxide dismutase (FeSODe) was used as the antigen in all cases (López-Céspedes et al., 2013; Marín et al., 2007). The partially purified fraction of the protein (FeSODe) was coated onto polystyrene microtiter plates (Nunc, Denmark) in carbonate buffer (pH 8.2) and incubated for 24 h in a humidity chamber at 4 °C. The plates were blocked with bovine serum albumin in 0.01 M phosphate buffered saline solution (PBS; pH 7.2) containing 0.05% Tween 20 (Merck KGaA, Germany).

The antibodies contained in a serum dilution of 1:100 in PBS were revealed with peroxidase-conjugated anti-dog immunoglobulin G (Thermo Fisher Scientific Cat# A18763, RRID:AB_2535540; dilution

Table 1

Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in dogs caught in animal control centers of Querétaro, México. Comparison of the proportion of seropositivity observed in Querétaro vs the proportion of seropositivity expected for endemic and non-endemic zones (see text for details).

	Endemic zones	Non-endemic zones
Observed proportion:	0.1023	
95% Conf. interval (normal):	0.068–0.136	
n:	303	
Hypothetical proportion (mean ± S.E.):	0.175 ± 0.019	0.084 ± 0.025
Z:	–2.6582	1.217
P:	0.0007	0.2233

Table 2

Association between zone (Urban, Periurban) and condition of infection (negative, positive for *Trypanosoma cruzi* [Tc], positive for *Leishmania mexicana* [Lm], positive for *T. cruzi* and *L. mexicana* [Tc + Lm]). Values in the lower panel were obtained with an analysis of adjusted residuals (Everitt, 1992). Cells with adjusted residuals (AR) in bold contribute significantly ($\alpha = 0.05$) to the association between zone and condition. Positive and negative AR values indicate observed frequencies higher and lower than the expected frequencies, respectively.

	Negative	Tc Positive	Lm Positive	Tc + Lm Positive
		Frequency observed		
Urban	159	16	1	0
Periurban	108	11	4	4
		Frequency expected		
Urban	155	16	3	2
Periurban	112	11	2	2
		Adjusted residuals		
Urban	1.41	0.13	–1.74	–2.37
Periurban	–1.41	–0.13	1.74	2.37

Pliego et al., 2011; García-Vázquez et al., 1995, 1995; Quijano-Hernández et al., 2012; Sosa-Jurado et al., 2004). Regarding to the results of *L. mexicana*, these are between the first reports of seropositivity for this parasite in Central Mexico, and between the few studies existent about the infection of dogs in Mexico. As a consequence, levels of endemicity for *L. mexicana* remain unknown. However, we have recorded the presence of *Leishmania* in wild carnivores and rodents from the metropolitan area of Querétaro (Orduna-Mayarez et al., unpublished data). These data suggest that vectors for both parasites could be present in the study area, especially for *L. mexicana*, as vectors are the only known route of transmission (Molyneux et al., 1981). However, as yet no triatomine bugs nor phlebotomine sand flies have been recorded from the study area. Demographic data would help us to know more about the transmission dynamics of *T. cruzi* in these reservoirs, however, since the samples were donations from animal control centers, there is no database on breed, age and sex of these dogs. Still, with the data obtained, it is possible to answer the question about the presence of this parasite in the metropolitan area of Querétaro.

In the study, it was expected that there would be a significantly greater proportion of positive indicators of exposure to the two parasites in the peri-urban areas as opposed to the urban areas, due to the conditions for the vectors and reservoirs is more similar to that of habitat types of vectors reported from other similar studies (Ramsey et al., 2015). This was true for the proportion of individuals which tested seropositive for both parasites (co-infection), but not for the proportions of exclusive seropositivity of either parasite. These results suggest similar presence of seropositive dogs in the urban and periurban areas, which could be explained by the high mobility of dogs in the study area (Arjona-Jiménez et al., 2012; Jiménez-Coello et al., 2015).

Although there are records for vectors of the studied parasites, (at

least for *T. cruzi*) in some parts of the state of Querétaro (Villagrán et al., 2008), no potential vectors have been reported for the study region of the metropolitan zone of Querétaro City. In order to support the positive results of the presence of *T. cruzi* and *L. mexicana* and assess the epidemiological risk factors to humans in this metropolitan area, more evidence concerning the life cycles of these parasites are needed. To this end, extensive and systematic searches for triatomine bugs and phlebotomine flies are required in the localities where the presence of seropositive dogs indicated the presence of these parasites.

Authors' contributions

The authors contributed equally to the conception, literature search, writing, and figure design pertaining to this study. All authors completely reviewed the article for intellectual content, and read and approved the manuscript.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethical approval

This project was approved by the Bioethics Committee of the Department of Natural Sciences of the Autonomous University of Querétaro (108FCN2017).

Funding

The first author would like to recognize CONACyT for the grant awarded during his graduate studies (CVU: 630717).

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest. There are no commercial associations that might create a conflict of interest in connection with submitted manuscript.

Acknowledgments

The authors wish to thank the animal control centers of the municipalities of Querétaro and El Marques for the donation of blood samples from dogs. They are also grateful for the support received by the staff of the Molecular Parasitology Laboratory of Universidad de Granada. The authors recognize Patrick Weill for his translation of the text from Spanish to English.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100459>.

References

- Arce-Fonseca, M., Carrillo-Sánchez, S.C., Molina-Barrios, R.M., Martínez-Cruz, M., Cedillo-Cobán, J.R., Henao-Díaz, Y.A., Rodríguez-Morales, O., 2017. Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in domestic dogs from Sonora, Mexico. *Infect. Dis. Poverty* 6. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0333-z>.
- Arjona, J.G., Zaragoza, V.M., Zaragoza, V.C., Herrera, R.G., Sánchez, M.M., Santamaría, M.E., Cruz, B.L., 2017. Anticuerpos de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* y *Leishmania braziliensis* en perros domiciliados de Tabasco, México. *Rev. MVZ Córdoba* 22, 5829–5836. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1011>.
- Arjona-Jiménez, G., Villegas, N., López-óspedes, Á., Marín, C., Longoni, S.S., Bolígon-González, M.E., Rodríguez-vivas, R.I., Sauri-arceo, C.H., Sánchez-moreno, M., 2012. Prevalence of antibodies against three species of *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum*) and possible associated factors in dogs from Mérida, Yucatán,

- Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.12.003>.
- Balan, L.U., Yerbes, I.M., Piña, M.A.N., Balmes, J., Pascual, A., Hernández, O., Lopez, R., Monteón, V., 2011. Higher seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs than in humans in an urban area of Campeche, Mexico. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11, 843–844. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0039>.
- Barbabosa-Pilego, A., Díaz-Albiter, H.M., Ochoa-García, L., Aparicio-Burgos, E., López-Heydeck, S.M., Velásquez-Ordóñez, V., Fajardo-Muñoz, R.G., Díaz-González, S., De Oca-Jiménez, R.M., Barbosa-Mirales, M., Guzmán-Bracho, C., Estrada-Franco, J.G., Garg, N.J., Vázquez-Chagoyán, J.C., 2009. *Trypanosoma cruzi* circulating in the southern region of the state of Mexico (Zumpahuacán) are pathogenic: a dog model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 390–395.
- Barbabosa-Pilego, A., Campos, P., Olivares, D., Aparicio-Burgos, J.E., Montes de Oca-Jiménez, R., Martínez-Gastañeda, J.S., Ochoa-García, L., Guzmán-Bracho, C., Estrada-Franco, J.G., Jain, N., Vázquez, J.C., 2011. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* in dogs (*Canis familiaris*) and triatomines during 2008 in a sanitary region of the state of Mexico, Mexico. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11, 151–156. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0163>.
- Benítez, E., 2018. Interview with Head of Animal Control Centre of Querétaro Municipality.
- Carrillo-Paraza, J.R., Manríquez Saide, P., Rodríguez-Buenfil, J.C., Escobedo-Ortegón, J.F., Rodríguez-Vivas, R.I., Bollo-González, M.E., Barrera-Pérez, M., Reyes-Novelo, E., Sauri-Arceco, C.H., 2014. Serological study of *Trypanosoma cruzi* and associated factors in dogs from a rural community of Yucatán, Mexico. *Arch. Med. Vet.* 46, 75–81. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100011>.
- Clopper, C.J., Pearson, E.S., 1934. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika* 26, 404. <https://doi.org/10.2307/2331986>.
- Cruz-Chan, J.V., Bollo-González, M., Collin-Flores, R., Ramírez-Sierra, M.J., Quijano-Hernández, I., Dumontel, E., 2009. Immunopathology of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Vet. Parasitol.* 162, 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.024>.
- Daniel, W., 1999. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. Estrada-Franco, J.G., Bhatia, V., Díaz-Albiter, H., Ochoa-García, L., Barbabosa, A., Vázquez-Chagoyán, J.C., Martínez-Peréz, M.A., Guzmán-Bracho, C., Garg, N., 2006. Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 624.
- Everitt, B.S., 1992. *The Analysis of Contingency Tables*. Chapman and Hall/CRC.
- Galaviz-Silva, L., Mercado-Hernández, R., Zárate-Ramos, J.J., Molina-Garza, Z.J., 2017. Prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en perros y pequeños mamíferos de Nuevo León, México. *Rev. Argent. Microbiol.* 49, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.rjam.2016.11.006>.
- García-Vázquez, Z., Rosario-Cruz, R., Miranda-Miranda, E., Domínguez-Marquez, A., 1995. A serological survey of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs of two urban areas of Mexico. *Prev. Vet. Med.* 25, 1–6. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(95\)00483-1](https://doi.org/10.1016/0167-5877(95)00483-1).
- Herrera, L., 2010. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Bol. Malaria. y Salud Ambient.* 50, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.fl.2009.03.004>.
- Jiménez-Coello, M., Poot-Coh, M., Ortega-Pacheco, A., Guzmán-Merín, E., Ramos-Ligón, A., Sauri-Arceco, C.H., Acosta-Viana, K.Y., 2008. American trypanosomiasis in dogs from an urban and rural area of Yucatán, Mexico. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 8, 755–762.
- Jiménez-Coello, M., Guzmán-Marín, E., Ortega-Pacheco, A., Acosta-Viana, K.Y., 2010a. Serological survey of American trypanosomiasis in dogs and their owners from an urban area of Merida Yucatán, Mexico. *Transbound. Emerg. Dis.* 57, 33–36. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01130.x>.
- Jiménez-Coello, M., Ortega-Pacheco, A., Guzmán-Marín, E., Guirris-Andrade, D.M., Martínez-Figueroa, L., Acosta-Viana, K.Y., 2010b. Stray dogs as reservoirs of the zoonotic agents leptospira interrogans, *Trypanosoma cruzi*, and *Aspergillus* spp. in an urban area of Chiapas in Southern México. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 10, 135–141. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0170>.
- Jiménez-Coello, M., Acosta-Viana, K., Guzmán-Marín, E., Bárcenas-Irabién, A., Ortega-Pacheco, A., 2015. American trypanosomiasis and associated risk factors in owned dogs from the major city of Yucatán, Mexico. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 21, 37. <https://doi.org/10.4137/1545-4049-015-0039-2>.
- Longoni, S.S., Marín, C., Sauri-Arceco, C.H., López-Céspedes, A., Rodríguez-Vivas, R.I., Villegas, N., Escobedo-Ortegón, J., Barrera-Pérez, M., Bollo-González, M.E., Sánchez-Moreno, M., 2011. An iron-superoxide dismutase antigen-based serological screening of dogs indicates their potential role in the transmission of cutaneous leishmaniasis and trypanosomiasis in Yucatán, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 815–821. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0125>.
- López-Céspedes, A., Longoni, S.S., Sauri-Arceco, C.H., Sánchez-Moreno, M., Rodríguez-Vivas, R.I., Escobedo-Ortegón, J.F., Barrera-Pérez, M.A., Bollo-González, M.E., Marín, C., 2012. Leishmania spp. epidemiology of canine Leishmaniasis in the Yucatán peninsula. *Sci. World J.* 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/945871>.
- López-Céspedes, A., Longoni, S.S., Sauri-Arceco, C.H., Rodríguez-Vivas, R.I., Villegas, N., Escobedo-Ortegón, J., Barrera-Pérez, M., Sánchez-Moreno, M., Bollo-González, M.E., Marín, C., 2013. Seroprevalence of antibodies against the excreted antigen superoxide dismutase by *Trypanosoma cruzi* in dogs from the Yucatán Peninsula (Mexico). *Zoonoses Public Health* 60, 277–283. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01520.x>.
- Marín, C., Sánchez-Moreno, M., 2009. The trypanosomiasis diagnosis: a review on the role of the superoxide dismutase as molecular marker. *Curr. Res. Microbiol.* 1, 1–12.
- Marín, C., Hitos, A.B., Rodríguez-González, I., Dollet, M., Sánchez-Moreno, M., 2004. Phytonomas iron superoxide dismutase: a possible molecular marker. *FEMS Microbiol. Lett.* 234, 69–74. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.03.007>.
- Marín, C., Longoni, S.S., Mateo, H., de Diego, J.A., Alunda, J.M., Minaya, G., Sánchez-Moreno, M., 2007. The use of an excreted superoxide dismutase in an ELISA and Western blotting for the diagnosis of *Leishmania (Leishmania) tufanum* naturally infected dogs. *Parasitol. Res.* 101, 801–808. <https://doi.org/10.1007/s10436-007-0551-6>.
- Mejía, A., Portugal-García, C., Chávez-López, V., García-Vázquez, Z., Ramos, C., 2017a. Evidencia serológica de infección por *Trypanosoma cruzi* en perros atendidos en clínicas veterinarias del área conurbada de Cuernavaca, Morelos. *Salud Publica Mex.* 59, 205–206. <https://doi.org/10.21149/7945>.
- Mejía, A., Portugal-García, C., Chávez-López, V., García-Vázquez, Z., Ramos, C., 2017b. *Salud Pública de México, Salud Pública Mex.* 59, 205–206.
- Molyneux, D.H., Ashford, R.W., 1983. *The Biology of Trypanosoma and Leishmania, Parasites of Man and Domestic Animals*. Taylor & Francis Ltd, London, UK.
- Molyneux, D.H., Croft, S.L., Lavin, D.B., 1981. Studies on the host-parasite relationships of Leptomonas species (Protozoa: Kinetoplastida) of Siphonaptera. *J. Nat. Hist.* 15, 393–406.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2010. *Enfermedad de Chagas: control y eliminación*. a63/17, pp. 1–5.
- Ortega-Pacheco, A., Guzmán-Marín, E., Acosta-Viana, K.Y., Vado-Solis, I., Jiménez-Delgado, B., Cárdenas-Marrufo, M., Pérez-Osorio, C., Puerto-Solis, M., Jiménez-Coello, M., 2017. Serological survey of *Leptospira interrogans*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in free roaming domestic dogs and cats from a marginal rural area of Yucatán Mexico. *Vet. Med. Sci.* 3, 40–47. <https://doi.org/10.1002/vms3.55>.
- Paredes, E.A.G., Valdez Miranda, J., Nogueira Torres, B., Alexandre Aguilera, R., Canett-Rodrigo, R., 2007. Vectorial importance of triatominae bugs (Hemiptera: Reduviidae) in Guymnas Mexico. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 43, 119–122.
- PNUDA, SEDESU, CONCYTEQ, 2008. *GED Zona Metropolitana Querétaro, Querétaro*.
- Quijano-Hernández, I.A., Castro-Barcena, A., Barbabosa-Pilego, A., Ochoa-García, L., Del Ángel-Caraza, J., Vázquez-Chagoyán, J.C., 2012. Seroprevalence survey of American trypanosomiasis in Central Valley of Toluca. *Sci. World J.* 2012, 1–3. <https://doi.org/10.1100/2012/450619>.
- Ramsey, J.M., Peterson, A.T., Carmona-castro, O., Moo-llanes, D.A., Nakazawa, Y., Butrick, M., Tun-ku, E., 2015. Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease 110, 339–352. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140404>.
- Salazar-Schettino, P.M., Bucio, M.I., Cabrera, M., Bautista, J., 1997. First case of natural infection in pigs: review of *Trypanosoma cruzi* reservoirs in Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 499–502.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1970. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. *Syst. Zool.* 19, 391–393. <https://doi.org/10.2307/2412280>.
- Sosa-Jurado, F., Zumaquero-Ríos, J.L., Reyes, P.A., Cruz-García, A., Guzmán-Bracho, C., Monteón, V.M., 2004. Biotic and abiotic determinants of seroprevalence of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in Palmar de Bravo, Puebla, Mexico. *Salud Publica Mex.* 46, 39–46.
- Vargas Martínez, F., Torres Guerrero, E., Arenas, R., Quintanilla Cedillo, M.R., 2011. *Leishmaniasis en México*. Med. Cutan. Ibero Lat. Am.
- Villagrán, M.E., Marín, C., Hurtado, A., Sánchez-Moreno, M., de Diego, J.A., 2008. Natural infection and distribution of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in the state of Querétaro, Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 833–838. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.05.005>.
- Villagrán-Herrera, M.E., Concha-Valdez, F.G., Sánchez-Moreno, M., de Diego Cabrera, J.A., Martínez-Ibarra, J.A., 2018. Coinfection of and *Leishmania* spp. in synanthropic reservoirs (*Canis familiaris*) in an endemic area of the state of Querétaro, use of FeSoDe as an antigenic tool. *J. Prev. Med.* 03, 1–7. <https://doi.org/10.21767/2572-5483.100032>.
- Zamora Ledesma, S., Hernández-Camacho, N., Villagrán-Herrera, M.E., Sánchez-Moreno, M., Concha-Valdez, F.G., Jones, R.W., Moreno-Pérez, M.A., Camacho-Macias, B., 2016. Presence of trypanosomid antibodies in gray foxes (*Urocyon canescens*) and domestic and feral dogs (*Canis lupus familiaris*) in Querétaro, Mexico. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 5, 25–30.