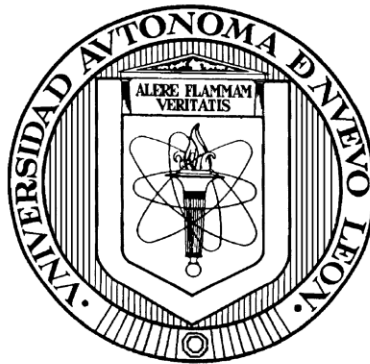


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



“Detección de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi* en perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) y vectores (Phlebotominae y Triatominae) en Nuevo León, México.”

POR

PILAR DE JESÚS SALAS RODRÍGUEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de

Maestría en Ciencia Animal

Junio 2024

“Detección de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi* en perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) y vectores (Phlebotominae y Triatominae) en Nuevo León, México.”

Aprobación de tesis por el comité particular de

Pilar de Jesús Salas Rodríguez

COMITÉ DE TESIS

Dra. Rosa María Sánchez Casas

Nombre y Firma

Presidente

Dra. Adriana Gutiérrez Díez

Nombre y Firma

Secretario

Dr. Juan José Zarate Ramos

Nombre y Firma

Vocal

“Detección de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi* en perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) y vectores (Phlebotominae y Triatominae) en Nuevo León, México.”

Aprobación de tesis por el comité particular de

Pilar de Jesús Salas Rodríguez

COMITÉ DE TESIS

Dr. Jorge Jesús Rodríguez Rojas

Director externo

Dr. Ildefonso Fernández Salas

Director externo

“Detección de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi* en perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) y vectores (Phlebotominae y Triatominae) en Nuevo León, México.”

Aprobación de tesis por el comité particular de

Pilar de Jesús Salas Rodríguez

COMITÉ DE TESIS

Dra. Rosa María Sánchez Casas

Director

Dr. Uziel Castillo Velázquez

Subdirector de Posgrado e Investigación

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por brindarme la confianza, el amor y completo apoyo en cada decisión tomada.

A mis hermanos y cuñadas, por su apoyo, cuidado y guía.
A mis sobrinos; José Miguel, Mateo, Patricio, María Fernanda y Valeria por ser mi principal fuente de motivación en la vida y brindarme fuerza cada día.

A mi directora de tesis, la Dra. Rosa María Sánchez Casas por creer en mi desde el primer día e incentivarme cada día a mejorar de manera profesional y personal.

Al Dr. Jorge Jesús Rodríguez Rojas por brindarme la confianza y la oportunidad de tener nuevas experiencias profesionales, por compartirme su conocimiento y sus consejos.

A mis compañeros y amigos de generación; Jonathan Perales, Estefanía Villanueva y Lourdes Xochipa por el apoyo físico y moral a lo largo de la maestría.

Al equipo de trabajo del CIDICS; Carlos Salazar, David Lozano, Noel Salinas, Josué Ortiz y Jesús Guzmán por su compañía en las salidas a campo y amistad brindada.

A los miembros del comité de tesis; el Dr. Juan José Zarate Ramos, el Dr. Idelfonso Fernández Salas, la Dra. Adriana Gutiérrez Diez por su participación en la investigación.

A la Dra. Edith Fernández Figueroa por la confianza y oportunidades brindadas, así como su enseñanza y su valiosa colaboración en este proyecto.
A la Dra. Yokomi Lozano Sardaneta por su valiosa colaboración en este proyecto.

DEDICATORIA

Para mi madre; por su indispensable compañía, por siempre creer en mí, apoyarme y ser mi sostén cada día.

Para mi padre; por ser mi ejemplo de fortaleza, brindarme su apoyo y protegerme.

Para mis hermanos y cuñadas; por guiarme, cuidarme y escucharme.

Para mis sobrinos; por iluminar mi vida con su existencia, ser mi motivación e inspiración.

Para el Biol. José Juan Ramírez por su apoyo, motivación y paciencia.
Para mis amigos Gerardo Calderón, María Fernanda Galván y Juan Carlos Bautista por su amistad, cariño y palabras de aliento.

Para la Dra. Rossy y el Dr. Jorge; por creer en mí y por brindarme su confianza.

Para mis amigos de generación Jonathan Perales, Estefanía Villanueva, Lourdes Xochipa por ser mis acompañantes en esta aventura.

Para mis amigos del CIDICS; Carlos Salazar, David Lozano, Noel Salinas, Josué Ortiz y Jesús Guzmán.

Para dos personas que se adelantaron en el camino, que recuerdo con mucho cariño y agradecimiento;

Para Mamá Pilar †.

Para el Dr. Gustavo Ponce García †.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	vii
ÍNDICE	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA	xii
RESUMEN	xiii
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES (LITERATURA REVISADA)	3
2.1 LEISHMANIASIS	3
2.1.1 LEISHMANIA	3
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	15
5.1 OBJETIVO GENERAL	15
5.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.2 ÁREA DE ESTUDIO	16
6.3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS	18
6.3.2 VECTORES	19
6.3.3 EXTRACCIÓN DE ADN	23
6.3.4 ANÁLISIS POR PCR	27

7. RESULTADOS	31
7.1 ANALISIS DE MUESTRAS SANGUÍNEAS POR PCR.....	31
7.1.1 LEISHMANIA	32
7.1.2 TRYPANOSOMA CRUZI	33
7.2 VECTORES.....	34
7.2.1 CAPTURA DE FLEBOTOMINOS.....	34
7.2.2 CAPTURA DE TRIATOMINOS.....	36
8. DISCUSIÓN.....	39
9. CONCLUSIONES.....	47
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica de las áreas de trabajo para la colecta de muestras sanguíneas de perros domésticos Nuevo León, México de septiembre 2022 a agosto 2023.	17
Figura 2. Ubicación geográfica de las áreas de trabajo para la colecta de flebotominos en Nuevo León, México de septiembre 2022 a agosto 2023.....	17
Figura 3. Ubicación geográfica de las áreas de trabajo para la colecta de triatomos en Nuevo León, México de septiembre 2022 a agosto 2023.....	18
Figura 4. Trabajo en campo con trampa Shannon. A) Medidas de trampa Shannon utilizada. B) Captura de flebotominos con aspirador bucal, cebo humano. C) Flebotomino capturado.....	19
Figura 5. Trabajo en campo con trampa de luz CDC. A) Trampa de luz CDC-UV, colocada en la rama de un árbol a 1.60 m de la superficie. B) Colocación de la trampa en campo C) Trampa de luz CDC-Incandescente.	19
Figura 6. Proceso de separación y preparación para montaje permanente en Euparal.	21
Figura 7. Montaje permanente en Euparal de ejemplar hembra. La cabeza del ejemplar fue separada del resto del ejemplar. El abdomen fue almacenado para su posterior análisis.	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Cebadores para detectar *Leishmania* spp en perros; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 2 Cebadores para detectar *T. cruzi* en perros; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 3 Cebadores para detección de *Leishmania* spp. en flebotominos.. **Error! Marcador no definido.**

Tabla 4 Cebadores de PCR COI para *T. cruzi* en triatominos; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 5 Cebadores para detectar *T. cruzi* por qPCR; **Error! Marcador no definido.**

Tabla 6 Cebadores para el gen SL-IRac..... 29

Tabla 7 Cebadores para el gen SL-IR I y II..... **Error! Marcador no definido.**

Tabla 8 Cebadores para el gen 24S -rADN **Error! Marcador no definido.**

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA

SÍMBOLO O ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
mL	Mililitros
μL	Microlitros
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
NaOH	hidróxido de sodio
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
LPG	Lipofosfogluano
PCR-RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

RESUMEN

La leishmaniasis y tripanosomiasis americana (o enfermedad de Chagas) son enfermedades causadas por parásitos como *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi*, respectivamente, los cuales son transmitidos por vectores. En México estas enfermedades son consideradas un problema de salud pública. Nuevo León junto con Coahuila y Tamaulipas comprenden un foco de riesgo de leishmaniasis y tripanosomiasis por su frontera con Texas, Estados Unidos de América, y un perfil epidemiológico en donde los vectores se asocian con mamíferos silvestres. Dado el limitado número de estudios sobre estas enfermedades en el noreste del país, en particular, los escasos reportes de leishmaniasis y tripanosomiasis en el estado de Nuevo León, el objetivo de nuestra investigación fue detectar ambos parásitos en perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) y en los insectos vectores (Phlebotominae y Triatominae) en Nuevo León, México, utilizando la técnica de detección molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Nuestros resultados en 300 muestras recolectadas de sangre periférica de perros domésticos fueron negativos para todos, obteniendo una positiva para *T. cruzi*. En el caso de los vectores, los 25 ejemplares capturados de flebotominos resultaron negativos para *Leishmania* spp., en triatominos, detectamos dos chinches positivas pertenecientes al municipio de General Bravo y Lampazos.

1. INTRODUCCION

La leishmaniasis y tripanosomiasis americana (o enfermedad de Chagas) son enfermedades causadas por parásitos como *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi*, respectivamente, los cuales son transmitidos por vectores. Estas enfermedades desatendidas forman parte de un conjunto de enfermedades infecciosas que afectan principalmente poblaciones en situación de pobreza. Sin embargo, debido a la escasa regulación para el traslado internacional de especies que son reservorio de estas enfermedades, la gran y rápida urbanización en los países y la amplia movilización de migrantes en los últimos años, estas enfermedades pueden encontrarse en prácticamente cualquier país.

En los últimos 20 años se han reportado 1,067,759 casos de leishmaniasis cutánea y mucosa en el Continente Americano. Por esta razón la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en la lucha para fortalecer el control y vigilancia de la leishmaniasis en el continente americano, promueve emprender acciones que engloben los casos en humanos, en reservorios domésticos y en el vector. México en el 2021 reportó una considerable reducción en los casos.

En el Continente Americano se reportan 30,000 casos nuevos de Chagas al año. En México esta enfermedad es catalogada como un problema de salud pública ya que se estima que más de un millón de personas se encuentran infectadas. El Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) indica que una correcta prevención y control de la enfermedad dependerá de la información actualizada sobre su vigilancia. Por ello, que en 2021 se aprobó la política de Una Salud, la cual busca abordar amenazas para la salud en la conexión entre animales reservorios, ambiente y seres humanos.

Los perros domésticos son uno de los principales reservorios de leishmaniasis, además de tener una importante participación como centinela de la infección por *T. cruzi*, pueden enfermar y transmitir nuevamente el parásito al vector. Debido a su presencia en zonas endémicas, así como actividades de

caza, depredación o acompañamiento del hombre, el perro se encuentra en una situación vulnerable de infectarse con estos parásitos.

Nuevo León junto con Coahuila y Tamaulipas comprenden un foco de riesgo de leishmaniasis y tripanosomiasis por su frontera con Texas, Estados Unidos de América, y un perfil epidemiológico en donde los vectores se asocian con mamíferos silvestres. Considerando los escasos estudios de ambas enfermedades en el norte del país y en particular los pocos reportes de leishmaniasis y tripanosomiasis en el estado de Nuevo León, en la presente investigación se buscó detectar molecularmente (técnica de reacción en cadena de la polimerasa, PCR) la presencia de estos parásitos en perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) y en los insectos vectores (Phlebotominae y Triatominae) en Nuevo León, México.

2. ANTECEDENTES (LITERATURA REVISADA)

2.1 LEISHMANIASIS

2.1.1 *LEISHMANIA*

Leishmania es un parásito hemoflagelado perteneciente al reino protista. Es heteroxeno, lo cual significa que puede colonizar dos huéspedes, infecta macrófagos, células dendríticas de piel y vísceras de mamíferos. El género de *Leishmania* consta de tres subgéneros según sea la ubicación del parásito en el intestino del vector; *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania* (Akhoundi *et al.*, 2016). Existen más de 20 especies del género que provocan tres presentaciones clínicas: leishmaniasis cutánea, mucocutánea o visceral (Alemayehu y Alemayehu, 2017).

2.1.1 Ciclo biológico de *Leishmania*

Cuando el parásito se encuentra en el intestino del vector (Phlebotominae), comienza un proceso de diferenciación y maduración (4-25 días). En este proceso los amastigotes cambian su morfología en promastigotes procíclicos y se adhieren al epitelio del intestino del vector mediante el lipofosfoglucono (LPG) localizado en la superficie del parásito. El promastigote procíclico se transforma en promastigote metacíclicos infectivo, lo que provoca cambios y la duplicación en el LPG, esto permite que el parásito se desprenda del epitelio y migre hacia la faringe y cavidad bucal del vector (Gluenz *et al.*, 2015).

Las hembras flebotomino utilizan la sangre ingerida para el desarrollo de huevos, al ingerirla adquiere al parásito si las células se encontraban infectadas. Al picar nuevamente para alimentarse, el flebotomino inocular al promastigote a 0.1 mm dentro de la piel del mamífero. Una vez que esto ocurre, las células de defensa (monocitos o macrófagos) fagocitan al parásito y una vez dentro de las fagolisosomas, los promastigotes se cambian en amastigotes, estos se dividen y

reproducen por fisión binaria dando como resultado el rompimiento de la célula, enseguida los amastigotes se liberan e infectan células vecinas. Estos animales pueden ser picados por otro insecto flebotomino e infectarlos (Alcolea *et al.*, 2019).

De acuerdo con el huésped, *Leishmania* adopta ciertas características morfológicas. Cuando se encuentra en el intestino del insecto vector, tiene una forma de promastigote, el cual se caracteriza por tener un flagelo anteronuclear que mide entre 12 y 20 μm . Cuando se localiza en algún mamífero, se transforma en amastigote, sin flagelos y redondeado con un diámetro entre 2.5 a 3.5 μm (Becker *et al.*, 2008).

En la Figura 1 podemos ver el cambio morfológico de *Leishmania* en el insecto vector.

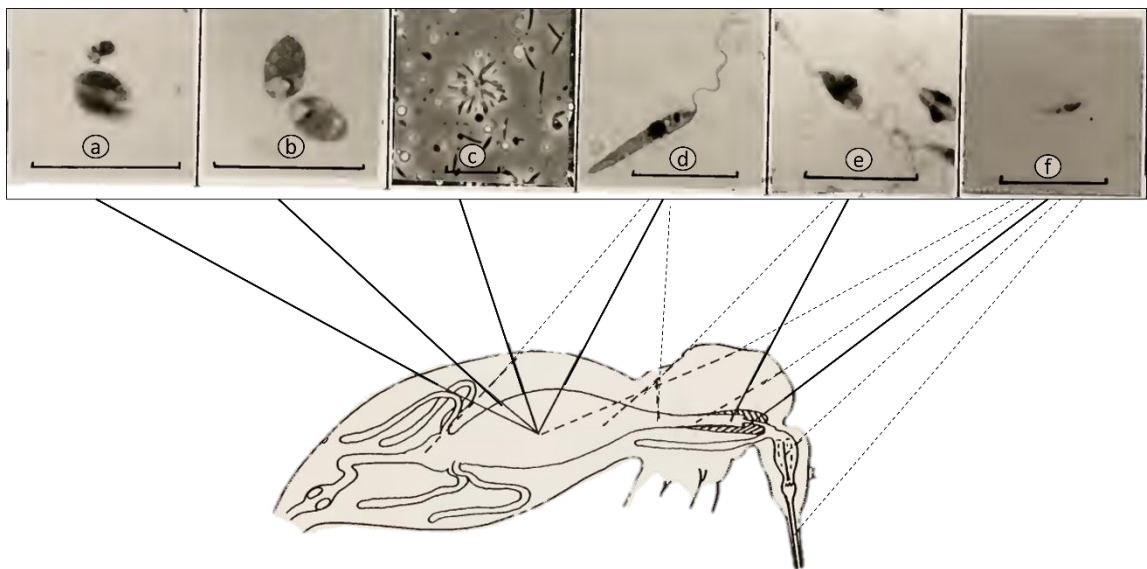


Figura 1. Migración y cambio morfológico de *Leishmania* spp. en flebotomino. a) Promastigotes ovoides, ligeramente móviles y con flagelos cortos en el intestino medio abdominal, nadando a través de la sangre, dentro del saco peritrófico. b) Promastigotes ovoides, se dividen por fisión binaria. c) Promastigotes de mayor tamaño q en a), alargados y formando rosetas, dirigiendo su flagelo hacia el centro. d) Promastigotes transformados en formas alargadas, delgadas y con mayor movilidad. e) Los promastigotes migraron a la porción anterior del intestino medio abdominal, los cardias y el triángulo posterior. Las formas divisorias se encuentran unidas mediante sus flagelos a la válvula estomadal, con una forma corta y ancha. f) Se lleva a cabo la migración más allá de la válvula estomodal, se invade faringe y aparato bucal. Se reduce el tamaño a promastigotes cortos, delgados y móviles (Pimienta *et al.*, 1992)

Factores ecológicos y moleculares son los encargados de mediar la interacción entre el parásito y el vector, ya que las condiciones dentro del tubo digestivo deben ser idóneas para el desarrollo de *Leishmania* (Antoniou *et al.*, 2013). El intestino medio de los vectores y las fagolisosomas comparten la característica de ser ambientes hidrolíticos, pero en el intestino medio existe una gran cantidad de aminoácidos y azúcares, con una temperatura de 26 °C y un pH ligeramente alcalino, en el segundo el pH es ácido, hay escasez de azúcar y los nutrientes principales son los aminoácidos y los ácidos grasos (Harms *et al.*, 1981; Zilberstein, 2018). La leishmaniasis comienza cuando el parásito *Leishmania* es inoculado por la picadura de un flebotomino a las células del sistema fagocítico mononuclear que por medio de receptores reconocen al parásito y lo fagocitan (Boecken *et al.*, 2011).

2.1.3 Vector de *Leishmania*

El parásito *Leishmania* es transmitido por la picadura de flebotominos hembras hematófagas, que son pequeños insectos de la familia Psychodidae. Los adultos alcanzan un tamaño menor de 5 mm de longitud, sus patas son largas, su cuerpo se encuentra revestido de pelos finos y largos (Cecílio *et al.*, 2022; Ready, 2013). Pertenece a la subfamilia Phlebotominae engloba diferentes especies de importancia en el continente americano (Cecílio *et al.*, 2022; Ready, 2013).

En México se encuentran 52 especies de Phlebotominae entre las cuales 14 se alimentan de mamíferos silvestres, existen reportes de ocho especies que ingieren sangre de mamíferos silvestres y domésticos y 12 de sangre humana (Ibáñez-Bernal y Duran-Luz, 2022; Ibáñez-Bernal y Rebollar-Téllez, 2023). Tienen actividad nocturna y crepuscular, sin embargo, pueden encontrarse activos durante el día, se reproducen en el suelo, en áreas húmedas y con presencia de materia orgánica (Cecílio *et al.*, 2022; Ready, 2013).

2.1.2 Epidemiología de la leishmaniasis

Mundialmente leishmaniasis es una de las diez principales enfermedades desatendidas, ya que 12 millones de personas actualmente se encuentran infectadas, del 2001 al 2021 se reportaron en promedio 52,645 casos de leishmaniasis cutánea y mucosa, y 2,488 de leishmaniasis visceral (OPS, 2023).

En América, la leishmaniasis visceral (LV) es una problemática en el sector de salud pública principalmente en el área del sur de Estados Unidos hasta Argentina (OMS, 2016). Leishmaniasis cutánea está presente en 20 países de América y es endémica en 18 de ellos, incluyendo México (OPS, 2022).

La incidencia anual en el continente americano de Leishmaniasis visceral presentó un incremento de 4,500 a 6,800 casos, en el caso de Leishmaniasis cutánea la incidencia incrementó de 187,200 a 307,800 casos (Alvar *et al.*, 2012).

Para el año 2019 se reportaron 1,014 casos, de acuerdo con el informe epidemiológico de las Américas que realiza la OPS. En el año 2020 debido a la situación sanitaria por la que atravesó el mundo, hubo un marcado descenso en el número de reportes de casos de leishmaniasis en México, la situación cambio para el año 2021 con un aumento en el reporte de casos del 60.5 % (520), cutánea 99.6 % (518) y mucosa 0.4 % (2) (OMS, 2020).

En México se han reportado casos aislados principalmente en regiones del Golfo como: Campeche, Veracruz, Yucatán, Quintana Roo y Tabasco; del Pacífico: Chiapas, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa; y del Centro: Morelos y Puebla (Iniesta *et al.*, 2019). Para el 2022 se reportaron un total de 964 casos de leishmaniasis cutánea en el país, la situación no mejoró en el 2023, ya que, de acuerdo con el último informe semanal del año, en México hubo 1136 casos (Secretaría de Salud, 2023).

Los estados al norte del país, como Tamaulipas, Coahuila y Nuevo León, representan una región en riesgo debido a la cercanía con Texas, Estados Unidos; es de gran importancia el papel del vector de transmisión en el ciclo de infección para que la enfermedad pueda presentarse, sin embargo, no se cuenta

con muchos estudios de los vectores en el sur de Estados Unidos y el norte de México (Ramos *et al.*, 2007).

2.1.4 Reservorios de *Leishmania*, con énfasis en perros

El perro (*Canis lupus familiaris*) es la especie que tiene mayor importancia como reservorio primario de *Leishmania* spp. y es afectada por *L. infantum* (= *L. chagasi*) principalmente (Alvar *et al.*, 2004). Existen pocos estudios en cuanto a la relación directa de *Leishmania* y *Canis lupus familiaris* como reservorio; sin embargo, en México se han reportado casos de leishmaniasis cutánea localizada en perros ocasionada por *L. mexicana* en Oaxaca, Tabasco, Quintana Roo y Ciudad de México, además la presencia de anticuerpos circulantes para *T. cruzi*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* en perros en Tabasco. Existe prevalencia de leishmaniasis en Guerrero, Chiapas se encontró la presencia de *Leishmania* en perros domésticos, así como reportes de casos de leishmaniasis visceral que ocasiona escasa respuesta inmune, debilidad y descarga ocular (Duthie y Courtenay, 2018; Arjona *et al.*, 2017; Rosete-Ortíz *et al.*, 2011; Iniesta *et al.*, 2019; Pérez-Zumaya, 2021).

En la zona norte del país también existen reportes de leishmaniasis en caninos, por medio de PCR-RFLP y secuenciación, se diagnosticó y determino a *L. mexicana* como agente causal del primer caso de leishmaniasis canina autóctona en Sinaloa (Castillo *et al.*, 2019). En el noreste de México, en Nuevo León se reportó el caso de un perro proveniente de Aragón, España con tres años habitando en el estado (Zárate-Ramos *et al.*, 2007), debido a que el periodo incubación es muy variable, el perro puede pasar años sin presentar síntomas y ser detectada la enfermedad (Van Bockstal *et al.*, 2020; Galaviz-Silva *et al.*, 2017).

2.2 Tripanosomiasis americana

2.2.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un parásito flagelado, de vida libre, digénico en vertebrados e invertebrados. El ADN del cinetoplasto representa de un 10 a 25 % del ADN total que consiste en dos tipos de ADN circulares, denominados como maxi círculos y mini círculos. *T. cruzi* tiene un periodo de incubación entre 5-42 días. La evolución clínica de la enfermedad se divide en tres fases: aguda, indeterminada y crónica. La primera se manifiesta regularmente en perros menores a un año, al día 17 post infección se alcanza un alto nivel de parasitemia y comienzan los signos clínicos, algunos de ellos son: letargia, esplenomegalia, hepatomegalia, anorexia, diarrea, entre otros (Peña-Sánchez, 2019). En la fase indeterminada no se presentan signos clínicos y no se detecta la presencia de parásitos. La última fase ocurre de 8 a 36 meses después de la infección y los principales signos son: insuficiencia cardíaca, miocarditis crónica y dificultad respiratoria (Santos y Menezes, 2020).

2.2.1 Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

El parásito *T. cruzi* es capaz de cambiar su morfología a tres formas principales: epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes (Melo *et al.*, 2020). Los epimastigotes tienen la capacidad de multiplicarse en el intestino del vector. Los tripomastigotes metacíclicos se desarrollan en el recto y son infectivos para los mamíferos. En su forma de amastigote se multiplican y cambian su forma en tripomastigote no replicativo, a esta forma se le denomina epimastigote intracelular (Melo *et al.*, 2020).

Cuando el parásito se encuentra en su forma de epimastigote tiene morfología fusiforme y mide 20-25 μm de longitud, el cinetoplasto se localiza cerca del núcleo y tiene flagelo en forma de membrana ondulante. La forma de amastigote, tiene una forma redonda y mide de 2-2.5 μm , el flagelo se encuentra secuestrado en una bolsa visible. El estadio de tripomastigote metacíclico tiene forma alargada y mide 20-25 μm de longitud. El flagelo tiene una membrana ondulante, el

tripomastigote sanguíneo puede infectar nuevas células o pasar al vector invertebrado (Becerril, 2008).

2.2.3 Vector de *T. cruzi*

Los triatomíneos son insectos hematófagos que defecan después de la ingestión de sangre, eliminando por medio de las heces al parásito (OMS, 2023). En México alrededor de 34 especies de triatomíneos se encuentran involucradas en la transmisión del parásito (OPS, 2022).

En Nuevo León se han realizado registros de distintas especies de triatomíneos entre los cuales se encuentran *T. gerstaeckeri*, *T. lecticularia*, *T. neotomae* y *T. protracta* en los municipios de Doctor Coss, General Bravo, General Terán, Santiago, China, Villaldama y Zuazua (Martínez-Pérez *et al.*, 2023; Martínez-Tovar *et al.*, 2013). Existen además hallazgos de triatomíneos infectados con *T. cruzi*, lo cual es un importante factor de riesgo de salud pública y veterinaria para el estado (Molina *et al.*, 2015).

2.2.2 Epidemiología de *T. cruzi*

En el mundo hay aproximadamente de seis a siete millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi*. Se estima que al año en el continente americano hay 30,000 nuevos casos, 12,000 muertes y aproximadamente 70 millones de personas en América están en riesgo de contraer la enfermedad. Se estima que cerca de un millón de habitantes padece la enfermedad en el país y 30 millones están en riesgo de contraerla (Salazar *et al.*, 2016). Los estados con mayor número de reportes de casos son Veracruz, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Chiapas y Guerrero. Sin embargo, al norte del país, en estados como Nuevo León la situación es similar a lo ya antes mencionado con la enfermedad leishmaniasis, debido a la cercanía con la frontera de Estados Unidos de América en donde sí han existido un mayor número de reportes de la enfermedad, por lo que existe un potencial de riesgo alto de contraer la enfermedad (Martínez-Tovar *et al.*, 2013). La enfermedad de Chagas puede ser transmitida de manera vectorial o

congénita; por ejemplo, un hombre de 35 años residente de Texas, pero originario de Nuevo León resultó positivo en cinco pruebas a tripanosomiasis americana, su familia poseía ranchos en Nuevo León, donde sus actividades principales eran alimentar a los animales, limpiar terrenos y actividades de jardinería. El paciente conoce a los triatominos y mencionó haberlos visto en repetidas ocasiones en las camas de los animales, este caso funciona como ejemplo de transmisión vectorial (Nolan *et al.*, 2018).

Por otra parte, en Nuevo León se identificó una seroprevalencia del 2 % para *T. cruzi* en la población (Molina *et al.*, 2015) en comparación con las estimaciones de prevalencia en otras regiones del país que llegan hasta el 13 % (caso particular el estado de Chiapas), ubicado en la frontera sur de México (Connors *et al.*, 2017).

La enfermedad no es exclusiva a una edad, ya que existen reportes de casos en menores de 18 años a lo largo de México como es en San Luis Potosí, Veracruz, Tabasco y Chiapas (Guadalupe *et al.*, 2021; Salazar *et al.*, 2016). Sin embargo, la tasa de enfermedad resultó ser más altas en adultos entre 25 a 44 años (Shelly *et al.*, 2016).

2.1.4 Reservorios de *Trypanosoma cruzi*, con énfasis en perros

El perro doméstico tiene un importante papel en el ciclo de la infección, pues tiene predisposición a enfermarse y transmitir nuevamente el parásito al vector, la presencia del agente, el vector y los reservorios generan ambientes para su ciclo de transmisión, exponiendo a personas y animales domésticos a la enfermedad (Grosskelwing, 2020).

Datos recolectados de anticuerpos contra *T. cruzi* en perros en el Estado de México muestran la necesidad de programas de vigilancia epidemiológica, además del hallazgo de anticuerpos contra *T. cruzi* en perros provenientes de Toluca, lugar que era considerado libre del parásito, y en caninos del estado de Yucatán. En Sonora, al noroeste de México se encontraron anti-T en perros, lo

que sugiere una transmisión por vectores (Estrada *et al.*, 2006; Arce *et al.*, 2017). Un foco de infección ocurrió en Misantla, Veracruz, donde tres cachorros resultaron ser el primer informe de tripanosomiasis aguda en la región (Grosskelwing, 2020). En Quintana Roo, México se realizaron pruebas serológicas a perros con signos clínicos de infección por triatomíneos, los cuales mostraron una alta frecuencia molecular de infección por *T. cruzi* (Salazar *et al.*, 2020). En Nuevo León, existe una prevalencia de infección por *T. cruzi* en pequeños mamíferos incluidos los perros (Galaviz-Silva *et al.*, 2017).

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leishmaniasis y tripanosomiasis americana son enfermedades desatendidas infecciosas transmisibles por vectores. La leishmaniasis canina es una enfermedad poco diagnosticada en México, debido a que en el país la leishmaniasis no es una enfermedad notificable ya que no existen campañas de detección activa, y los datos representativos pueden estar alejados de la realidad y ser una pequeña porción del número total de pacientes infectados. De la misma manera, cuando existen caninos seropositivos a *T. cruzi* es un indicativo de la posibilidad activa de transmisión.

Los casos de estas enfermedades se dan principalmente en zonas tropicales alejadas a las zonas urbanas, pero como consecuencia de la gran movilidad de población en los últimos años, se han llevado estas enfermedades hasta zonas urbanas. Además, los perros son los principales contribuyentes al mantenimiento de la transmisión de estas enfermedades. Se ha demostrado que la presencia del vector y la infección canina preceden a los casos humanos, justificando la necesidad de la identificación del vector y de los perros infectados. Muchos de los casos de leishmaniasis y tripanosomiasis no muestran signos clínicos en mucho tiempo y los perros perduran con una apariencia sana. Cuando se lleva a cabo la detección serológica de ambos parásitos debe tomarse en cuenta la detección cruzada en sueros de pacientes infectados con *Leishmania* spp. y *T. cruzi*, ya que se pueden encontrar en un área en común, infectando a los mismos vectores y hospederos. Además, cuando una muestra presenta títulos bajos de anticuerpos es muy común que el resultado sea negativo, por esta razón es importante llevar a cabo la detección y diagnóstico por pruebas moleculares como PCR.

Debido a la importancia de estas enfermedades para la salud pública y veterinaria, así como la relación de los parásitos con *Canis lupus familiaris* y el ambiente, estas zoonosis deben ser vistas desde el punto de vista de Una Salud, donde la medicina humana y veterinaria se unen para aportar alternativas de

prevención y control. El primer paso para comenzar con esto, puede ser la detección de estos parásitos, contribuyendo así a tener un registro epidemiológico más completo. En Nuevo León, los informes sobre huéspedes reservorios silvestres y domésticos de ambos parásitos, son pocos en comparación con lo reportado en estudios del sur y centro del país. En algunos países en los últimos dos años los reportes de casos se redujeron debido a que el enfoque en temas de salud pública fue COVID-19, lo que afecta directamente a la información epidemiológica de las enfermedades en general.

4. HIPÓTESIS

Los tripanosomátidos *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi* están presentes en poblaciones de perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) y en los vectores Phlebotominae y Triatominae en municipios de la zona urbana y semiurbana de Monterrey, Nuevo León, México.

5. OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de los parásitos *Leishmania* spp. por PCR y *T. cruzi* por qPCR en poblaciones de perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) y en sus vectores (Phlebotominae y Triatominae) en municipios de la zona urbana y semiurbana de Monterrey, Nuevo León, México.

5.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar los parásitos (*Leishmania* spp. y *T. cruzi*) en muestras sanguíneas de perros por PCR.
2. Localizar en los vectores (flebotominos y triatominos) los parásitos (*Leishmania* spp. y *T. cruzi*) por PCR.
3. Determinar la proporción de infección de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi* en perros e insectos vectores.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.2 ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se realizó durante septiembre de 2022 – agosto 2023 en el estado de Nuevo León en municipios de la zona urbana y semiurbana de Monterrey: Apodaca, Allende, Cadereyta Jiménez, General Escobedo, García, General Terán, Guadalupe, Juárez, Montemorelos, Monterrey, San Nicolás de los Garza y Salinas Victoria (Cuadro 1, Figura 2).

Cuadro 1. Ubicación geográfica de los municipios en los que se llevó a cabo la recolecta de muestras sanguíneas para la detección de *Leishmania* spp. y *T. cruzi*.

Municipio	Coordenadas geográficas	Altitud
Apodaca	25°46'54"N 100°11'19"O	405 m
Allende	25°17'13"N 100°00'30"O	380 m
Cadereyta Jimenez	25°35'26"N 100°00'05"O	360 m
García	25°49'00"N 100°35'00"O	697 m
General Escobedo	25°49'30"N 100°21'29"O	510 m
General Terán	25°15'26"N 99°41'09"O	310 m
Guadalupe	25°40'39"N 100°15'35"O	500 m
Juárez	25°38'50"N 100°05'45"O	374 m
Montemorelos	25°11'14"N 99°49'36"O	342 m
Monterrey	25°40'17"N 100°18'31"O	540 m
San Nicolas de los Garza	25°44'30" N 100°18'07" O	512 m
Salinas Victoria	25°57'36"N 100°17'27"O	464 m

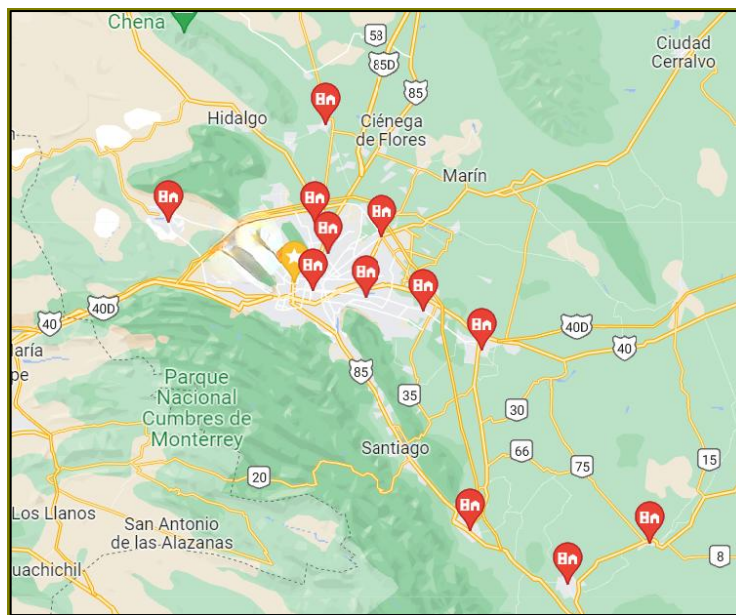


Figura 2. Ubicación geográfica de las áreas de trabajo para la colecta de muestras sanguíneas de perros para la detección de *Leishmania* spp. y *T.cruzi*.

La captura de flebotominos y triatominos se llevó a cabo en el periodo septiembre 2022 – agosto 2023, en los municipios de Allende, Cadereyta Jiménez, General Terán y Montemorelos (Figuras 3 y 4).

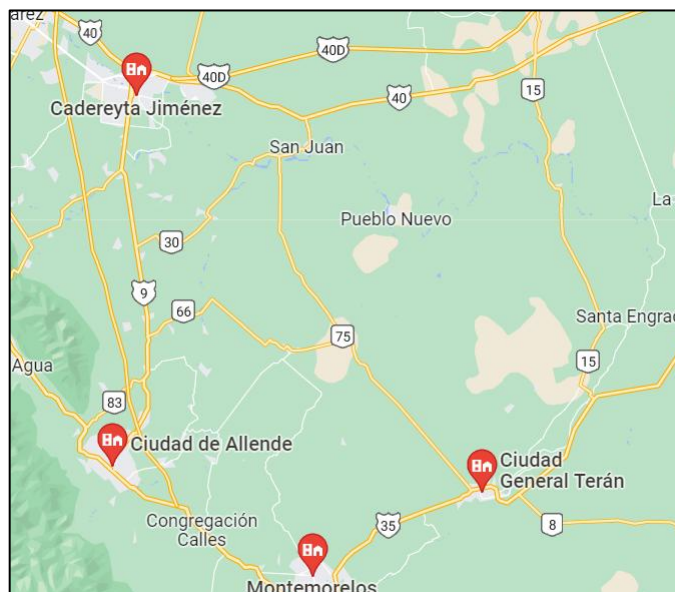


Figura 3. Ubicación geográfica de las áreas de trabajo para la colecta de flebotominos para la determinación de infección por *Leishmania* spp. en municipios de la zona urbana y semiurbana de Monterrey, Nuevo León, México.

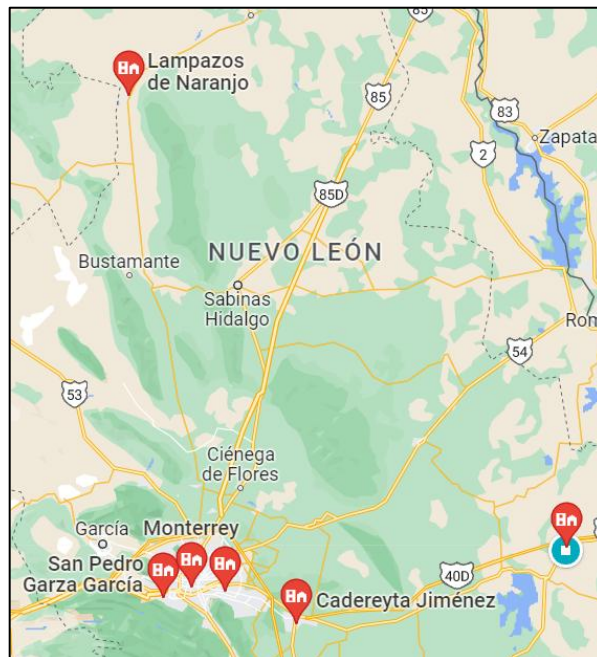


Figura 4. Ubicación geográfica de las áreas de trabajo para la colecta de triatominos para la detección de *T. cruzi*.

6.3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

Se tomó sangre periférica de perros domésticos en colonias, centros de control canino y clínicas veterinarias. Cada muestra obtenida de perros domésticos fue extraída bajo el conocimiento del proyecto y consentimiento por parte del propietario (Anexo 1).

El protocolo realizado fue aprobado por el Comité de Bienestar Animal, con el dictamen 36/2022, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UANL.

Se consideraron los siguientes criterios de inclusión para la selección de los perros domésticos muestreados: i) aprobación del dueño de acuerdo con el Anexo 1, ii) perros mayores a cuatro meses de edad, y iii) que no estuvieran en estado de gestación o en recuperación de alguna intervención quirúrgica.

La toma de muestra sanguínea se realizó por médicos veterinarios zootecnistas, extrayendo 4 mL de sangre periférica y se depositó en tubos Vacutainer® con EDTA. Posteriormente se almacenó la muestra a 4 °C por máximo una semana para su posterior análisis.

6.3.2 VECTORES

6.3.2.1 Captura de flebotominos

Se recolectaron flebotominos en los meses de octubre 2022 y abril 2022 utilizando trampas Shannon con aspirador bucal y trampas de luz CDC de luz UV e incandescente para su captura (512; John W. Hock Co., Gainesville, FL, EU.) (Figura 5 y 6). Las trampas fueron colocadas de la siguiente manera: dos trampas CDC en transectos de 20 m en un lapso de seis horas (19:00 -1:00). Para la colocación de las trampas fueron seleccionadas áreas públicas y seguras.

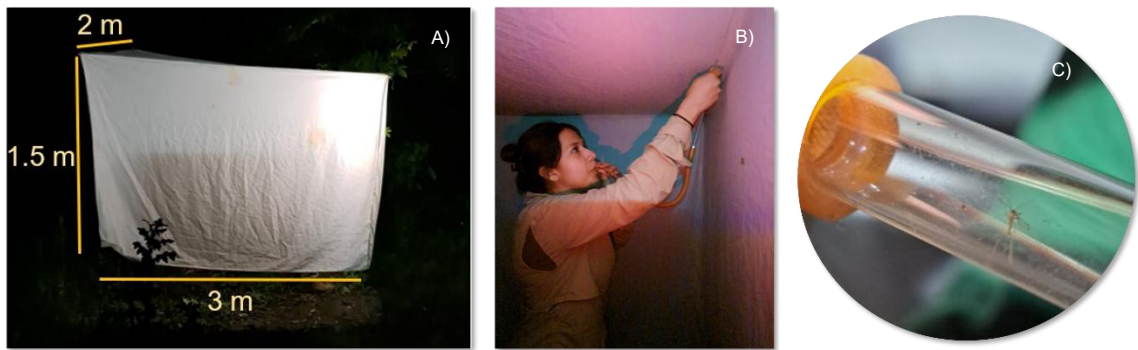


Figura 5. Trabajo en campo con trampa Shannon. A) Medidas de trampa Shannon utilizada. B) Captura de flebotominos con aspirador bucal, cebo humano. C) Flebotomino capturado.



Figura 6. Trabajo en campo con trampa de luz CDC. A) Trampa de luz CDC-UV, colocada en la rama de un árbol a 1.60 m de altura. B) Colocación de la trampa en campo C) Trampa de luz CDC-Incandescente.

Los ejemplares capturados por medio de aspirador bucal en la trampa Shannon se almacenaron en viales con alcohol al 70 % etiquetados con tipo de trampa, hora de captura y nombre de los colectores, para su posterior identificación en la unidad de patógenos emergentes en el CIDICS.

6.3.2.2 Montaje e identificación de flebotominos

En el laboratorio los insectos capturados por las trampas CDC fueron separados por tamaño, dejando los más pequeños para su visualización en estereoscopio. 2. Los ejemplares fueron separados por sexo. Cada hembra fue colocada en un portaobjetos para realizar un corte entre la unión del tórax y del abdomen, este último fue almacenado en alcohol al 70% para la detección molecular de presencia de *Leishmania* spp. 3. El resto del ejemplar y los machos enteros se maceraron con NaOH al 20 % por 24 horas. Cada ejemplar fue colocado en un pocillo de una placa de porcelana y cubierto con un portaobjetos limpio. Pasadas las 24 horas se realizó un lavado con agua destilada en el que cada ejemplar fue pasado a otro pocillo, dejándolo reposar por 20 minutos. 4. Seguido a esto, se llevó a cabo la deshidratación de cada ejemplar con una serie de alcoholes (60 %, 70 % y 80 %) x 15 minutos cada uno. 5. Una vez realizados los lavados se continuó con la diafanización con alcohol isopropílico y esencia de clavo por 25 minutos (Figura 7).

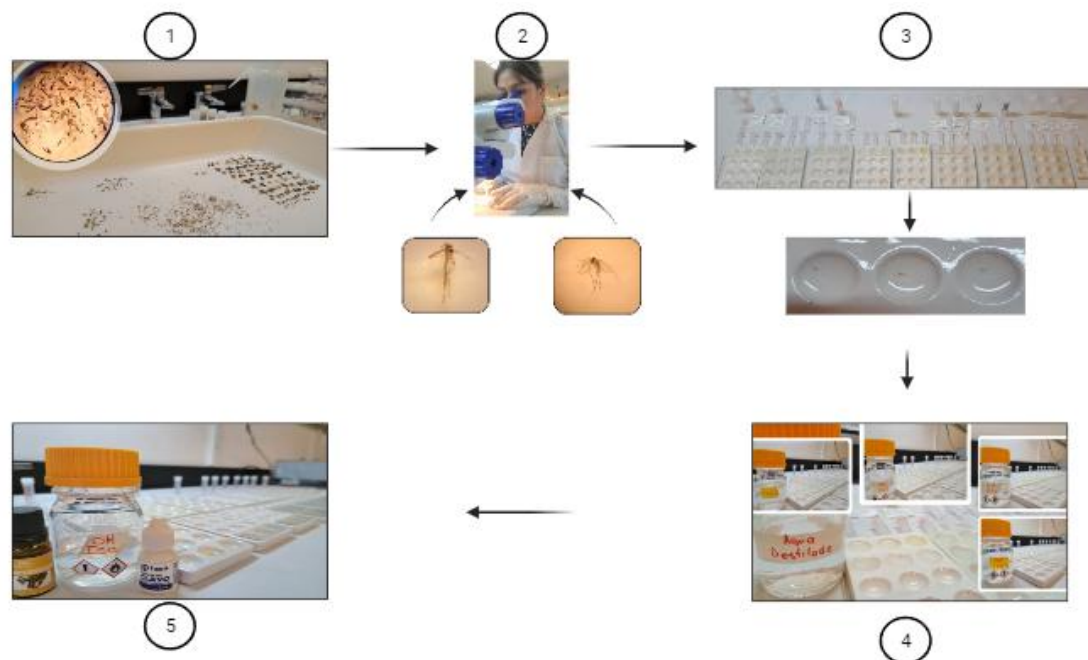


Figura 7. Proceso de separación y preparación para montaje permanente en Euparal. El montaje en Euparal se realizó como lo indica Ibáñez-Bernal (1999). Se diseccionaron las hembras en un portaobjetos en el que se le colocó una gota de Euparal, después se realizó un corte con dos agujas estériles en la unión de la cabeza y el tórax, colocando la parte ventral de la cabeza hacia arriba y el tórax de manera lateral. Para la disección de los machos se realizó un corte para la separación de la cabeza, mientras que el abdomen permaneció unido al tórax y la genitalia (Figuras 8 y 9). Para la identificación taxonómica se utilizaron las claves dicotómicas estipuladas por Ibáñez-Bernal (2005a, 2005b) que definen la especie con base en la clasificación sus estructuras particulares y diferencia hembra- macho (Figura 10 y 11).



Figura 8. Montaje permanente en Euparal de ejemplar hembra. La cabeza del ejemplar fue separada del resto del ejemplar. El abdomen fue almacenado para su posterior análisis.



Figura 9. Montaje permanente en Euparal de ejemplar macho. La cabeza del ejemplar fue separada del resto del ejemplar. El abdomen queda unido al tórax y a la genitalia.



Figura 10. Cabeza montada en Euparal de un ejemplar hembra. Se observa el cibario, una de las estructuras características de los flebotominos hembras (círculo rojo).



Figura 11. Genitalia montada en Euparal de un flebotomino macho. Estructura característica y distintiva de los machos.

6.3.3 Identificación de triatominos

La identificación taxonómica se realizó de acuerdo con las claves dicotómicas establecidas por Lent y Wygodzinsky (1979) y Gurgel *et al.* (2021) con las cuales se observan las estructuras principales (Figura 12).



Figura 12. Ejemplar de triatomo capturado.
En la imagen se muestran las principales estructuras morfológicas que se requieren identificar para su clasificación taxonómica.

6.3.3 EXTRACCIÓN DE ADN

6.3.4.1 Muestras sanguíneas

En el Laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UANL se realizó la extracción de ADN. Se utilizó kit comercial (Bioneer Accuprep®, Corea), empleando el protocolo establecido por el fabricante (Figura 13).

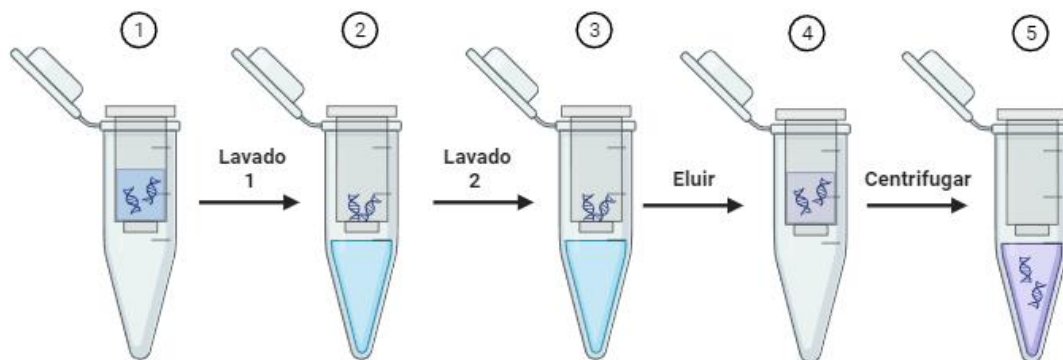


Figura 13. La extracción de ADN por medio del kit comercial Bioneer, consiste en una serie de dos lavados para llevar a cabo la adherencia del material genético a las columnas incluidas en el kit.

Se colocaron 200 µL de sangre completa en un tubo de 1.5 mL, al cual se le agregó 20 µL de proteinasa k más 400 µL de buffer de lisis, se incubó por 10 minutos a 60 °C. Para que se llevara a cabo la lisis celular.

Pasados los 10 minutos se agregaron 400 microlitros de etanol, se mezcló por pipeteo y después se pasó el líquido a un tubo con una columna para realizar los lavados como se muestra en la figura 12. Para los lavados se colocó 500 microlitros de buffer de lavado 1, después se centrifugo 1 minuto a 8000 rpm, se decantó el líquido filtrado y se agregaron 500 microlitros del buffer de lavado 2. Se decanto nuevamente después de centrifugar bajo las mismas condiciones, enseguida se volvió a centrifugar para eliminar todo residuo de buffers o alcohol.

Finalmente se añadieron 200 microlitros de buffer de elución, el cual provoca el desprendimiento del ADN de la columna, obteniendo de esta manera el material genético deseado.

6.3.4.2 Flebotominos

Para la detección de *Leishmania* spp. en flebotominos se realizó la extracción de ADN a partir del abdomen de cada ejemplar capturado. Mediante el método de resina Chelex. El principio de esta técnica se basa en la adición de muestras a suspensiones calientes de la resina (Gautam, 2022). En la Figura 14 se describen detalladamente los pasos que se siguieron para la obtención de ADN por este método.

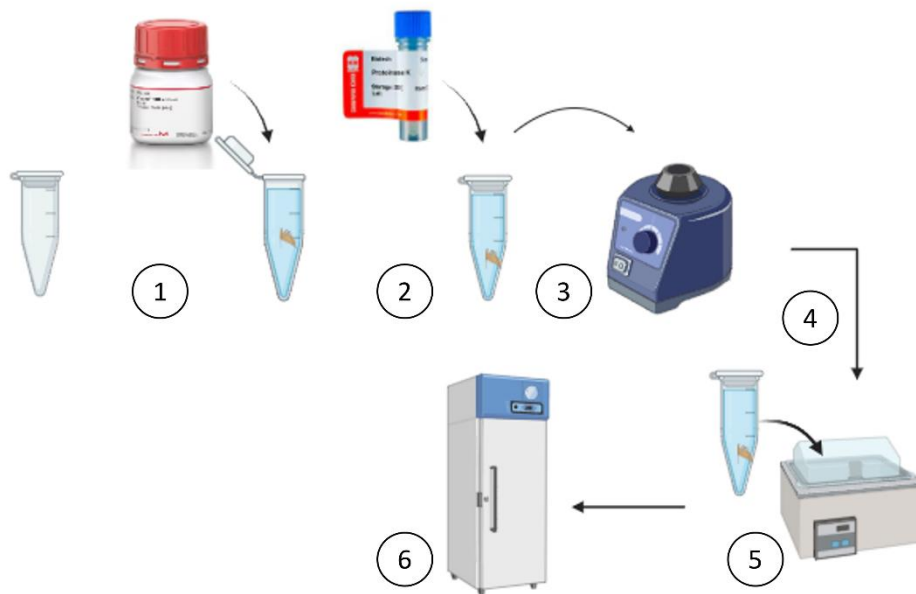


Figura 14. Extracción de ADN a partir del abdomen de ejemplares flebotominos. En un tubo se agregaron 1 gr de resina Chelex 100 y 10 μ L de agua caliente (70 °C). Se mezcló hasta que se vea la mezcla homogénea y no se vean sedimentos. Se agregaron 15 microlitros de proteinasa k por cada muestra. Se mezcla por vortex para homogenizar. Se colocó en baño Mario a 56 °C por 12 horas. Pasadas las 12 horas se aumenta la temperatura a 90 °C para inactivar la proteinasa k. Finalmente se sacan las muestras y se refrigeraron hasta su uso.

6.3.4.3 Triatominos

Se extrajo el ADN del intestino del triatomo (Figura 15) con el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Roche (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante (Figura 16).



Figura 15. Corte longitudinal con bisturí en el abdomen de triatomo para extracción de intestino.

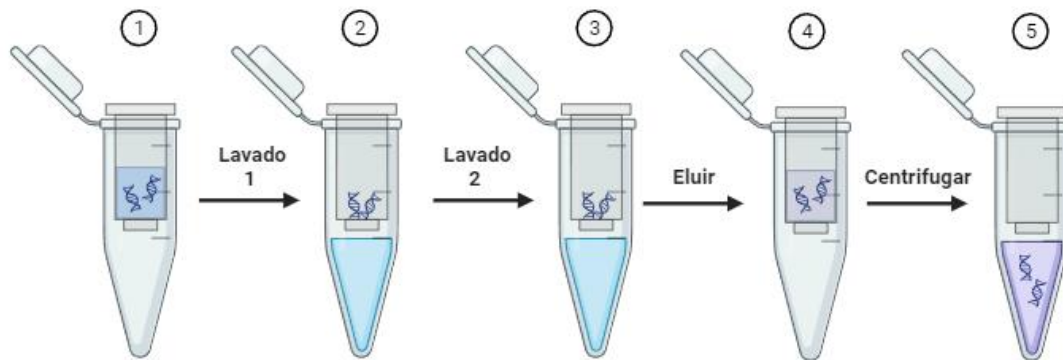


Figura 16. La extracción de ADN por medio del kit comercial High Pure PCR Template Preparation, consiste en una serie de dos lavados para llevar a cabo la adherencia del material genético a las columnas incluidas en el kit.

Se realizó un corte en el abdomen de cada triatomo para obtener el intestino. Una vez que fue retirado del ejemplar el intestino fue colocado en 400 μ L de buffer de lisis y 40 μ L de proteinasa k para la digestión de este. Se incubó la mezcla por 1:30 hora a 56 °C. Enseguida se le adicionaron 200 μ L de buffer de unión, se mezcló y centrifugó brevemente. La muestra fue incubada por 10 minutos a 70 °C. Después se agregaron 100 microlitros de isopropanol y se pasó toda la mezcla a un tubo con columna, para proceder a realizar los lavados con el buffer de lavado. Después de cada lavado se centrifugó y decantó el filtrado. El ADN fue eluido con 100 μ L de buffer de elución.

6.3.4 ANÁLISIS POR PCR

Para la detección de *Leishmania* spp. en perros utilizamos como control positivo ADN de *L. infantum*, extraído a partir de un cultivo celular con el estuche comercial de extracción Biooner (Accuprep®, Corea). Como control negativo se utilizó agua grado biología molecular para asegurar que no existiera contaminación en las muestras. La amplificación se realizó en el termociclador Bio-Rad T100 bajo las condiciones reportadas por Rodgers *et al.* (1990) que indican el uso del par de cebadores 13 a y 13 b (Cuadro 2).

Para la detección por PCR de *T. cruzi* en perros se utilizó como control positivo ADN de *Leishmania mexicana* a partir de un cultivo celular. Como control negativo se utilizó agua grado biología molecular para asegurar que no existiera contaminación en las muestras. La amplificación se realizó en el termociclador Bio-Rad T100 bajo las condiciones descritas por Wincker *et al.*, (1994) las cuales indican el uso del par de cebadores TC12 y TC122 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Cebadores utilizados para detectar *Leishmania* spp y *T. cruzi* en perros domésticos y flebotominos.

Organismo por detectar	Nombre de cebador	Cebador (secuencia 5'-3')	Tamaño de amplicon (pb)	Acceso GenBank
<i>Leishmania</i> spp.	13 a	GTG GGG GAG GGG CGT TCT	116	AJ131633
	13 b	ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT		
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Tc1	AAA TAA TGT ACG GG (T/G) GAG ATG CAT GA	330	AJ747944
	Tc2	GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA		
<i>Leishmania</i> spp.	LITSR	CTG GAT CAT TTT CCG ATG	300-350*	
	L5.8S	TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT		

Los fragmentos amplificados se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % en 100 mL de buffer SB 1X a 90 V por 60 minutos, como buffer de carga se utilizó azul de bromofenol. Para la tinción de los amplicones se usó

GelRed TM Nucleic Acid Gel Stain, la visualización se realizó con irradiación UV en el transiluminador MultiDoc-Lt. Digital Imaging System (Upland CA, USA).

Para la detección por PCR de *Leishmania* spp. en flebotominos seguimos el protocolo utilizado por Lozano-Sardaneta *et al.* (2020), para el cual se requieren los cebadores LITSR y L58S (Cuadro 2). Como control positivo utilizamos ADN extraído de cultivo celular correspondiente a *Leishmania mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. infantum*.

Los fragmentos amplificados se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en 100 mL de medio TBE. A la mezcla le agregamos 4 µL de Midori se corre el gel a 90 V por 60 minutos con irradiación de UV en el transiluminador MultiDoc-Lt. Digital Imaging System (Upland CA, USA).

Para la detección por qPCR de *Trypanosoma cruzi* en triatominos, se realizó cebador una PCR punto final para COI, de acuerdo con el protocolo de amplificación establecido por (Sudman y Hafner, 1992). Se utilizó como control positivo uno comercial de la empresa AB.

Después se llevó a cabo la genotipificación de *Trypanosoma cruzi* en triatominos siguiendo los protocolos de (da Cruz Moreira y Ramírez, 2019; Ramírez y da Cruz Moreira, 2019). En primera estancia se realizó un qPCR con los cebadores y sonda descritos en el cuadro 3.

Cuadro 3. Cebadores para detectar *T. cruzi* por qPCR

Cebadores <i>T. cruzi</i> SatADN		Cruzi1	Cruzi2	Cruzi3
	ASTCGGCTGATCGTTTTCGA		AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	FAM- CACACACTGGAACACCA A-NFQ-MGB

Una vez que obtuvimos los resultados, a las muestras positivas procedimos a realizar una PCR punto final.

El protocolo de amplificación indica que se deben realizar una serie de PCR (Figura 17). Para la primera prueba los cebadores utilizados fueron los indicados en el cuadro 4. Seguido de esto, se realizó una segunda prueba con los cebadores marcados en la fila 2 del cuadro 4. Y por último dos pruebas con los cebadores de la fila 3 del cuadro 4.

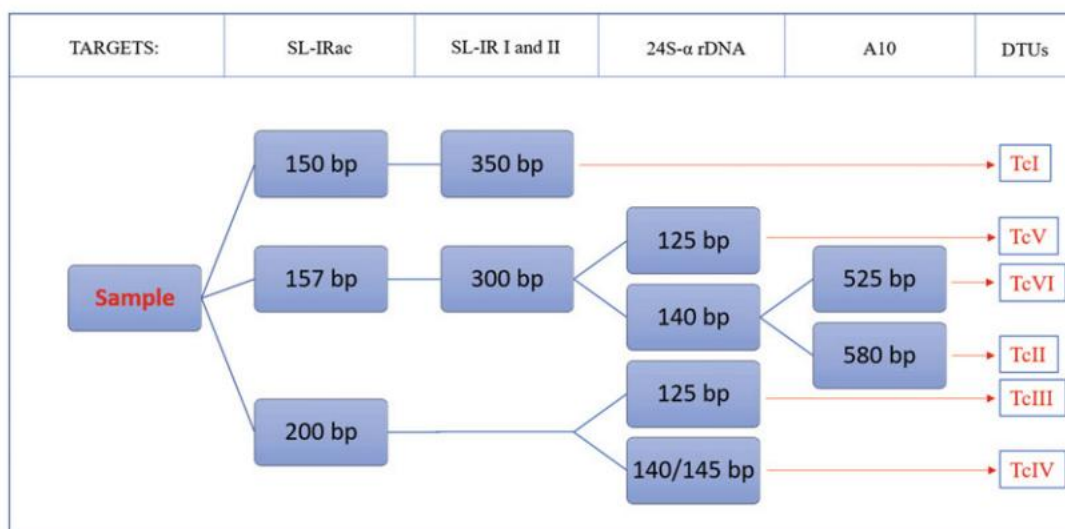


Figura 17. Productos de amplificación para DTUs. Se muestra el tamaño (pb) del producto de la amplificación para cada genotipificación (da Cruz Moreira y Ramírez, 2019).

Cuadro 4 Cebadores para el gen SL-IRac

TARGETS:	SL-IRac	SL-IR I and II	24S-α rDNA	A10	DTUs
Sample	150 bp	350 bp			TeI
	157 bp	300 bp	125 bp	525 bp	TeV
			140 bp	580 bp	TeVI
	200 bp		125 bp		TeII
			140/145 bp		TeIII
					TeIV

Los fragmentos amplificados se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % en 100 mL de medio TAE 1X. La tinción de los amplicones y visualización se realizó de la manera ya mencionada.

7. RESULTADOS

7.1 ANALISIS DE MUESTRAS SANGUÍNEAS POR PCR

Fueron recolectadas y analizadas un total de 300 muestras sanguíneas de perros domésticos provenientes de los municipios mencionados.

El municipio del cual se obtuvieron la mayor cantidad de muestras fue Salinas Victoria (20.74 %). Los municipios de Montemorelos y General Terán representan el menor porcentaje de muestras obtenidas con el 2.38 % y 1.02 %, respectivamente (Figura 18).

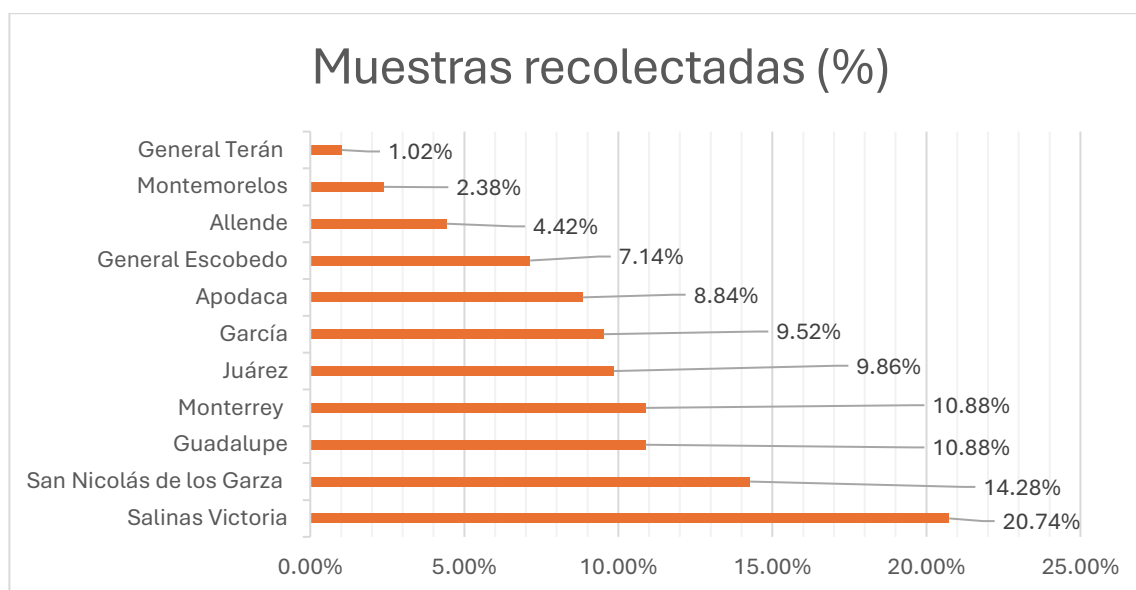


Figura 18. Porcentaje de muestras sanguíneas recolectadas por municipio en el estado de Nuevo León, México.

Las muestras fueron recolectadas en clínicas veterinarias, centros de control canino y colonias. En municipios como Gral. Terán, Montemorelos, Allende y Salinas Victoria, el 100% de muestras obtenidas fueron de colonias. Se obtuvieron diversas respuestas por parte de la población durante el muestreo, ya que no todas las personas que tenían perro accedían a participar en la investigación.

La participación de las clínicas veterinarias fue escasa ya que solo el 36 % de las clínicas a las que asistimos nos donó muestras sanguíneas.

A partir de los centros de control canino de cada municipio obtuvimos el 37 % de las muestras sanguíneas recolectadas.

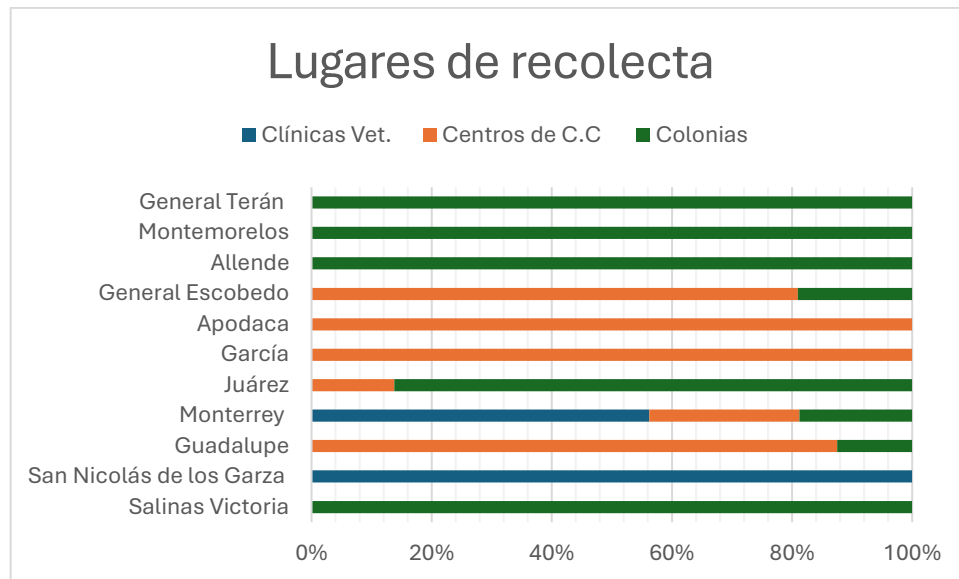


Figura 19. Muestras recolectadas por municipio a partir de clínicas veterinarias, centros de control canino y colonias en los diferentes municipios del estado de Nuevo León.

7.1.1 *Leishmania*

De las 300 muestras analizadas de los diferentes municipios del estado todas fueron negativas para *Leishmania* spp. (Figura 20).

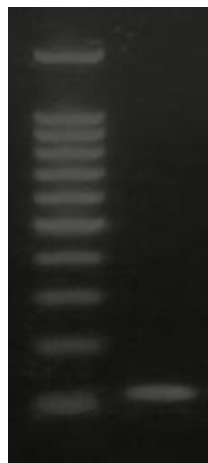


Figura 20. Control positivo en PCR punto final utilizado para detectar *Leishmania* spp.

7.1.2 *Trypanosoma cruzi*

De las 300 muestras analizadas para la detección de *T. cruzi*, un perro proveniente del municipio de Guadalupe dio resultado positivo.

Como antecedente al caso clínico de este perro se le realizó una prueba SNAP® que resulto positivo a *Leishmania* spp. Después de realizarse la prueba PCR para *Leishmania* spp. Y resultar negativo, se realizó un frotis y se observó la estructura característica de *T. cruzi* (Figura 21b). Esto fue confirmado por PCR (Figura 22).

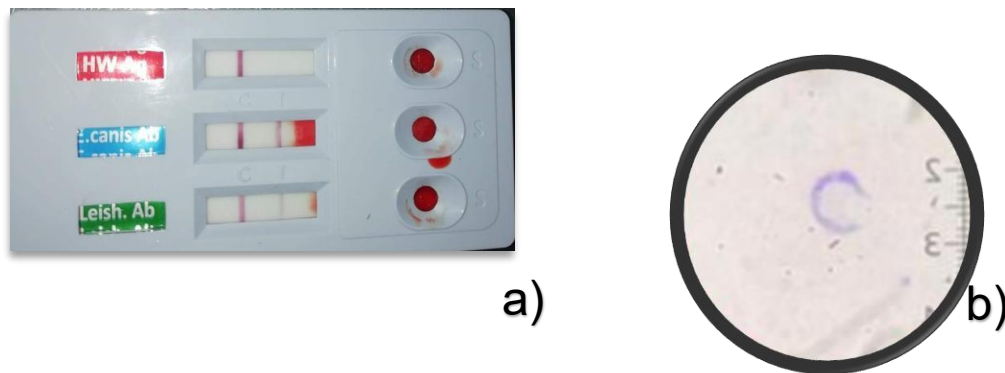


Figura 21. A) Prueba rápida de SNAP para detección rápida de *Leishmania* spp. b) Frotis realizado a muestra de sangre positiva en SNAP a *Leishmania*. Se observa en morado la morfología característica de *T. cruzi*.

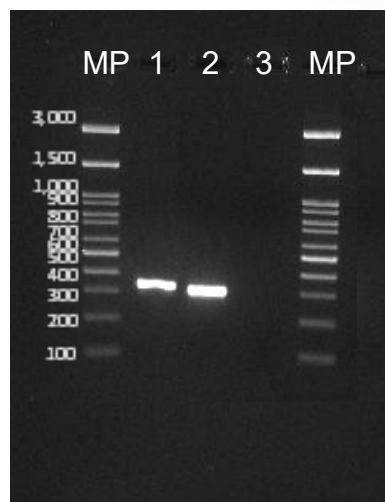


Figura 22. Análisis por PCR. Gel de agarosa 2%. MP: Marcador de peso molecular de 100 pb, Carril 1: Producto de 330 pb kADN (*T. cruzi*), Carril 2: Control positivo *T. cruzi*, Carril 3: Control negativo.

7.2 VECTORES

7.2.1 CAPTURA DE FLEBOTOMINOS

Fueron capturados 25 ejemplares, el mayor número de ejemplares fue capturado en Allende con 60 % del total de ejemplares (Figura 23).

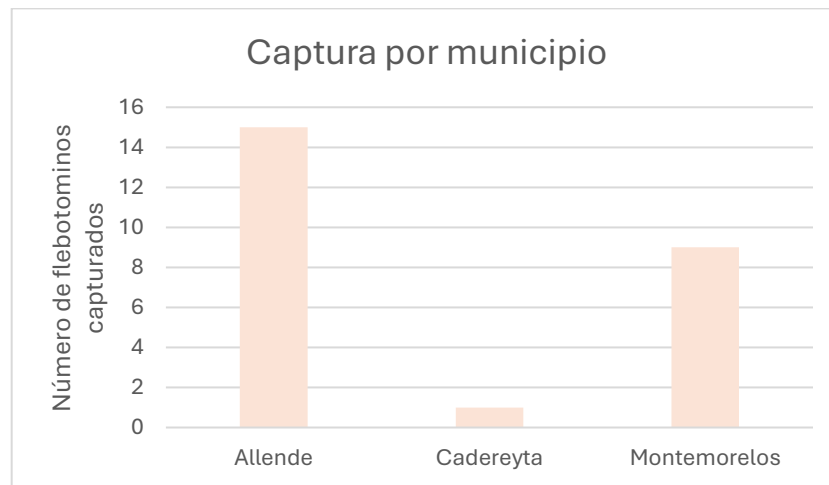


Figura 23. Número de ejemplares capturados en los diferentes municipios del estado de Nuevo León, México en el mes de abril 2023, con trampa Shannon y CDC.

El 56 % de los ejemplares capturados fueron machos (Figura 24).

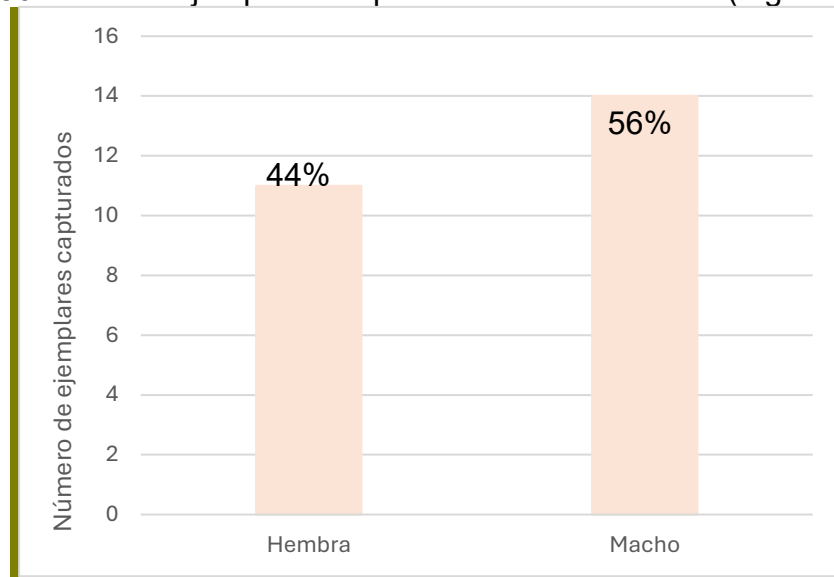


Figura 24. Porcentaje de hembras y machos flebotominos capturados en los municipios muestreados en Nuevo León, México.

Con las trampas Shannon y CDC con luz incandescente se capturaron el 72% de ejemplares, a diferencia de la trampa CDC con luz UV con la cual solo se capturo un 28% (Figura 25).

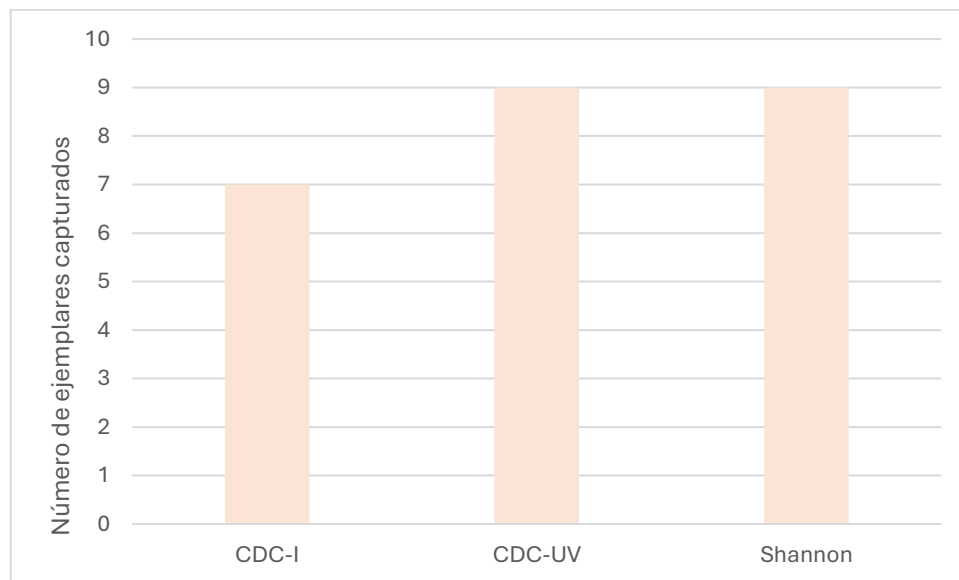


Figura 25. Número de ejemplares capturados por tipo de trampa en Nuevo León, México.

Fueron identificadas cuatro especies de flebotominos: *Psathyromyia texana*, *Psathyromyia cratifer*, *Micropygomyia vindicator* y *Lutzomyia cruciata* (Figura 26).

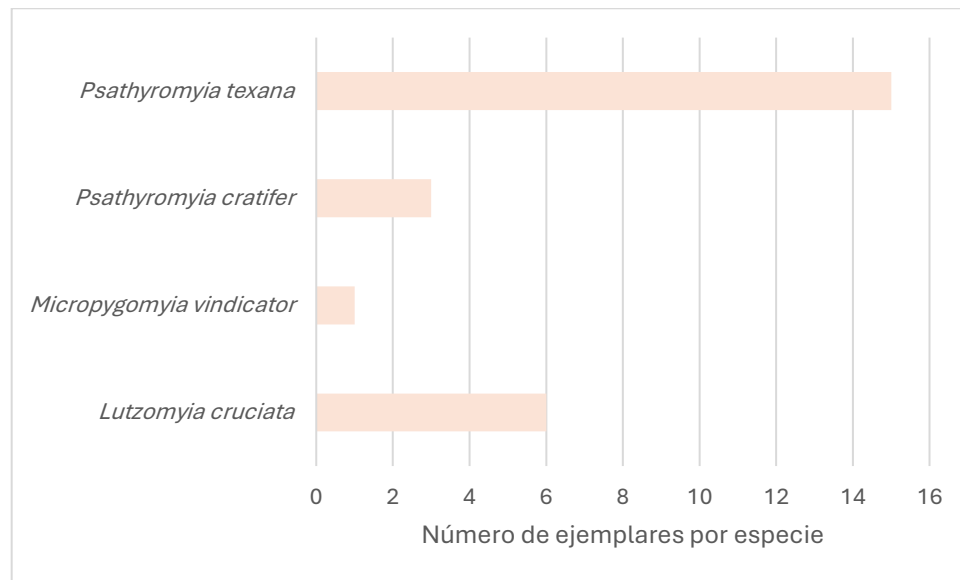


Figura 26. Especies de flebotominos identificadas taxonómicamente por claves dicotómicas. Los ejemplares fueron colectados en Cadereyta, Montemorelos, Allende y General Terán.

7.2.2 CAPTURA DE TRIATOMINOS

Se capturaron 34 ejemplares de triatominos, de los cuales el mayor porcentaje se obtuvo de Lampazos pertenecientes a la especie de *Triatoma gerstaeckeri* (Figura 27).

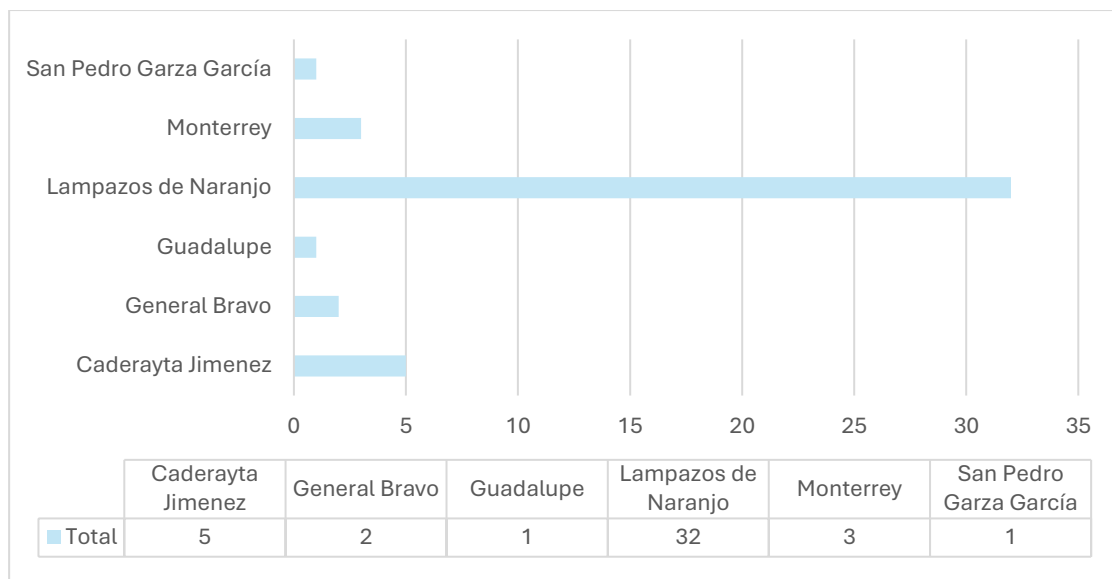


Figura 27. Número de ejemplares capturados por municipio del estado de Nuevo León, México.

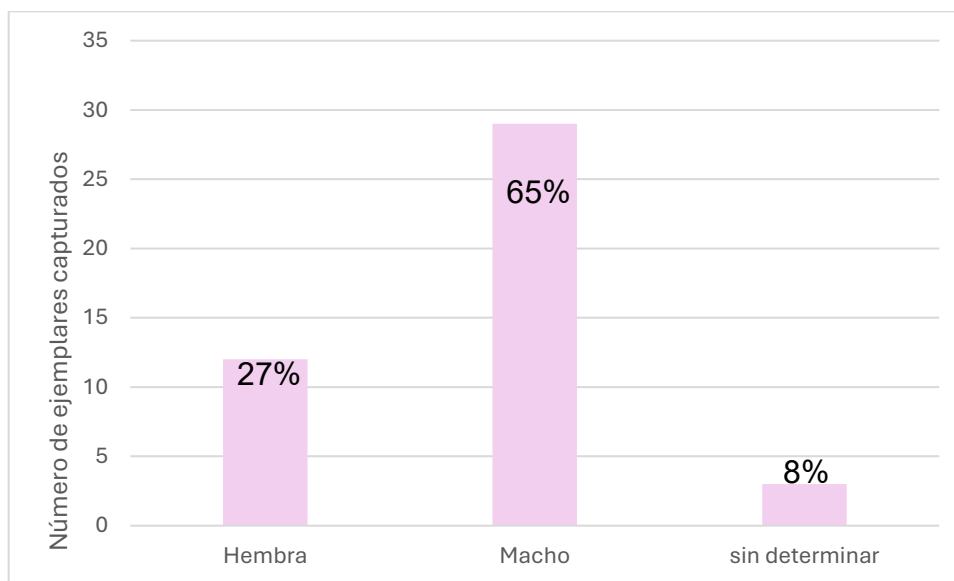


Figura 28. Porcentaje de hembras y machos capturados en Nuevo León, México.

Se analizaron 16 triatomíneos hembra de los cuales dos resultaron positivos a *T. cruzi*, uno de Lampazos y otro de General Bravo. En la Figura 29 y 30 podemos observar el análisis por qPCR de las 16 muestras de intestinos de triatomíneos.

Obtuvimos dos muestras positivas una proveniente de Lampazos y la otra de General Bravo.

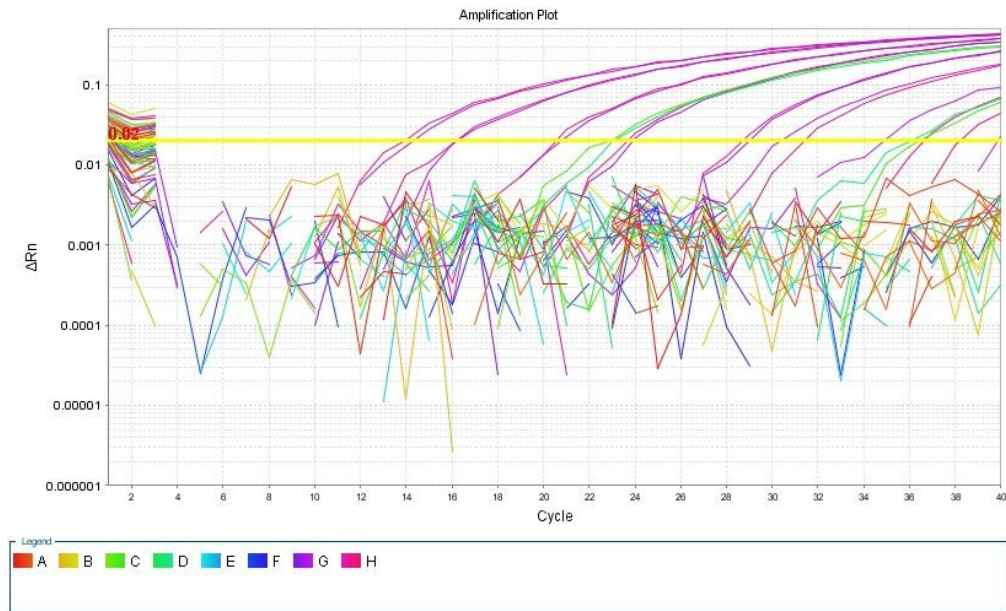


Figura 29. Resultados del análisis por qPCR a los 16 ejemplares de triatominos, se muestra la amplificación para dos muestras, lo que indica la presencia del parásito en el vector.

Seguido de esto, se realizaron una serie de PCR para identificar a que DTU corresponden las muestras positivas (Figura 30).

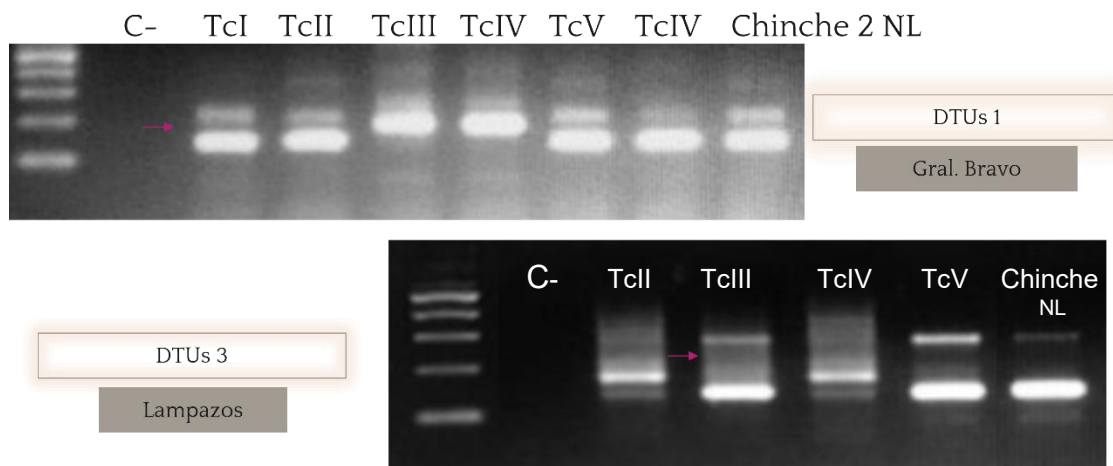


Figura 30. Resultados del análisis por PCR a los 2 ejemplares de triatominos positivos.

8. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en nuestra investigación demuestran la presencia de *T. cruzi* en poblaciones de caninos domésticos en el estado de Nuevo León, el perro positivo fue una hembra cruza con pitbull de dos años, que presentó mucosas pálidas, lesiones muco cutáneas con descamación en piel distribuidas en cabeza, dorso, orejas y cola, así misma presencia de petequias en la zona abdominal. Esto coincide con lo reportado por Torrechilha *et al.* (2023), entre los hallazgos clínicos presentados reportaron lesiones cutáneas en el 75.7 % de los perros que participaron en el estudio, dermatitis, lesiones ulcerosas, baja masa corporal, además menciona que el 100 % de los perros presentaron al menos un signo clínico.

La infección por *T. cruzi* puede presentarse de manera asintomática, lo que tiene como consecuencia una complicación en la detección temprana de la enfermedad (García-Sánchez *et al.*, 2021). Por consiguiente, es importante realizar una certera detección con pruebas serológicas o moleculares. Cuando la infección se encuentra en fase crónica, la parasitemia es baja, el diagnóstico se efectúa por métodos serológicos en los que se busca detectar anti- *T. cruzi* (OPS, 2023). Sin embargo, García-Sánchez *et al.*, (2021) reporta en su estudio que los resultados obtenidos por PCR fueron seis veces más sensibles que los del ensayo ELISA, dado que la PCR se fundamenta en la detección directa del material genético del parásito. Otra de las problemáticas con el diagnóstico serológico de *T. cruzi* es que suelen presentar falsos positivos, debido a que existe una detección cruzada con *Leishmania* spp. Abras *et al.* (2016). Por estos motivos, optamos por esta técnica y protocolo en nuestro trabajo. La detección de *T. cruzi* en sangre de caninos domésticos se llevó a cabo por medio de la técnica PCR punto final con el par de cebadores Tc121 y Tc122, el protocolo de estos cebadores descrito por Sturm *et al.* (1989) está basado en la amplificación de un fragmento de 330 pb de minicírculos de ADNk, en ventaja de esto es que resulta altamente sensible y específico. Truyens *et al.*, (2021) realizaron una

comparación entre métodos serológicos y PCR con distintos cebadores, entre ellos los utilizados en nuestro estudio, concluyeron que realizar la detección de *T. cruzi* requiere de estandarizar una prueba serológica pero que esta debe ir acompañada de una prueba molecular, ya que las serológicas tienen diferencias en el rendimiento y comprobaron que esto no va ligado a las diferencias en la parasitemia. García *et al.* (2017) utilizaron este par de cebadores para la detección molecular por PCR punto final de *T. cruzi* en sangre de donadores. Este par de cebadores también han sido utilizados para la detección de *T. cruzi* en muestras de médula ósea, en un estudio de Quintana Roo, se realizaron pruebas serológicas y PCR punto final, dando como resultado positivo el 42.5 % de las pruebas realizadas en medula ósea (Salazar-Grosskelwing *et al.*, 2020).

Los perros pueden fungir como centinelas en el ciclo de transmisión de *T. cruzi*, Galaviz-Silva *et al.* (2017) reportaron los primeros casos autóctonos en Nuevo León de infección por *T. cruzi* en zorrillos rayados, perros y zarigüeyas. La prevalencia que ellos encontraron fue mayor en zonas rurales (perros en edad juvenil 35.7 %, perros en edad adulta 13.3 % y perros juveniles en zona suburbana 12.5 %), esto resulta distinto a lo que nosotros reportamos, pues el perro positivo habitaba en el municipio de Guadalupe, en la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

En el norte del país se han realizado estudios para determinar la presencia de anti- *T. cruzi* en perros domésticos mediante el ensayo ELISA determinando las antiinmunoglobulinas G y M (IgG e IgM), así como una segunda prueba AFI como confirmatoria; se reportó una seropositividad del 4.44 %, cabe destacar que no asociaron la tasa con edad, sexo o nivel socioeconómico (Arce-Fonseca *et al.*, 2017). En nuestro estudio únicamente analizamos muestras de perros domésticos de colonias, clínicas veterinarias y centros de control canino, sin embargo, las actividades que realiza un perro pueden ser un factor de riesgo en la infección y transmisión de *T. cruzi*, entre ellos es que pueden llegar a alimentarse de triatominos, si tienen actividades de caza o acompañamiento a

campo (Tenney *et al.*, 2014; Travi, 2019). Curtis-Robles *et al.* (2017) reportaron que más del 50 % de los perros que analizaron en su estudio tenían anticuerpos para *T. cruzi* y en el 17 % de los perros encontraron ADN del parásito por medio de PCR, además de reportar que más del 80 % de los triatominos recolectados en las perreras donde se encontraban los perros del estudio, estaban infectadas. Rodríguez *et al.* (2021) encontraron un 45.3 % de prevalencia en perros domésticos con genotipo TcI, en 30 de los ejemplares analizados, 9 con TcIV y un perro con ambos genotipos en regiones fronterizas al sur de EUA. Zamora-Ledesma *et al.* (2020) reportaron una seropositividad del 10.2 % en perros alojados en centros de control canino animal en la zona metropolitana de Querétaro, en nuestro estudio no encontramos resultados positivos en los centros de control canino de la zona metropolitana de Monterrey.

Analizamos un total de 16 ejemplares de triatominos hembras, obteniendo dos muestras positivas para *T. cruzi* provenientes de Lampazos y General Bravo, ambas de la especie *T. gerstaeckeri*.

El primer reporte de triatominos infectados con *T. cruzi* en el estado de Nuevo León se remonta hasta 1947 cuando el Dr. Eduardo Aguirre Pequeño, reportó la especie *Triatoma gerstaeckeri*. Entre los municipios donde realizamos la recolecta esta General Terán en el cual no obtuvimos ejemplares de triatominos, sin embargo, Martínez-Ibarra *et al.* (1992) reportaron la presencia de esta especie y de *Triatoma lecticularia* en el municipio.

Fernández-Salas (1987) reportó la presencia de *Triatoma gertaeckeri* en los municipios de Anáhuac, Agualeguas, China, Dr. González, Dr. Coss y Gral. Terán, estos municipios presentan climas secos, semisecos y semicálidos húmedos, sin embargo, en climas extremadamente seco como en el municipio de Mina, N.L., no hubo capturas de estos ejemplares, también informó la colecta de *Triatoma noetomae*, *Triatoma protracta woodi* y *Triatoma lecticularia occulta*. Las cuatro especies presentaron infección por *T. cruzi*.

Nuestra colecta en los municipios fue únicamente por participación ciudadana y por trampeo con trampas Shannon y de intercepción. Molina-Garza *et al.* (2007)

reportaron la presencia de chinches *T. gerstaeckeri* infectadas con *T. cruzi* en el municipio de Gral. Terán colectadas en nidos de ratas *Neotoma micropus*. Al sureste del país existen reportes de DTU's como TcII, TcV, TcVI en Veracruz; en Tabasco y Campeche TcI, TcII, TcIII, TcV y TcVI se aislaron de primates (Murillo-Solano *et al.*, 2021; Ruíz-Sánchez *et al.*, 2005).

En este proyecto los ejemplares positivos fueron provenientes del municipio de Lampazos y de General Bravo, en este último Martínez-Tovar *et al.* (2013), también colectó triatominos de la especie *T. gerstaeckeri*.

Con los hallazgos en esta investigación aportamos el primer reporte de DTUs en el estado de Nuevo León y en la zona noreste del país, con la genotipificación DTU TcI y TcIII en los triatominos de *T. gerstaeckeri*. Los reportes sobre DTUs en esta especie son muy escasos, así como para el estado de Nuevo León y en el noreste de México. En el resto del país se han identificado en otras especies de triatominos como *Triatoma dimidiata* DTU's como TcII, TcV, TcVI en Veracruz (Murillo-Solano *et al.*, 2021; Ruíz-Sánchez *et al.*, 2005). También en comunidades rurales del sur del país se recolectaron triatominos y fueron identificadas dos especies: *Triatoma dimidiata* y *Panstrongylus rufotuberculatus* con DTUs TcI, TcII, TcIV y TcVI (Joselin *et al.*, 2021).

En cuanto a los triatominos, un factor de riesgo es la cercanía con la frontera del estado de Texas, EUA. Busselman *et al.* (2021) llevaron a cabo un seguimiento a perros que habitaban en zonas con factores de riesgo, como reportes de muertes caninas por Chagas, la presencia de vectores, además de estar en cautiverio en criaderos. Sus resultados mostraron que los perros que habitan en lugares con estos factores de riesgo tienen un 30.7 % de adquirir *T. cruzi* en el plazo de un año. Así mismo, Curtis-Robles *et al.* (2017) reportaron una seroprevalencia de 31.6 % en perros en el estado de Texas, EUA, en zonas donde se recolectaron ejemplares de *Triatoma gerstaeckeri* con infección de *T. cruzi*.

En las regiones fronterizas al sur de EUA uno de los vectores más importantes en la transmisión de la enfermedad es *Triatoma gerstaeckeri* (Rodríguez *et al.*,

2021). Esta especie de triatomino estuvo presente en nuestras colectas y los dos ejemplares positivos pertenecen a esta especie. Chaves *et al.* (2023) reportaron que el tiempo de defecación en esta especie es más rápido, tiene la capacidad de invadir espacios peri domésticos, el lapso de alimentación es más corto, lo cual le otorga la mayor eficiencia vectorial entre *T. protacta*, *T. recurva* y *T. rubida*. Además de que presenta una alta prevalencia de infección parasitaria (Reineta, 1970; Rodríguez *et al.*, 2021)

Por otra parte, en Nuevo León no se han registrado casos autóctonos de leishmaniasis canina. En 2007, se reportó un caso en el municipio de Monterrey de un perro macho de seis años, raza Bull Terrier Inglés proveniente de Aragón, España, que llevaba tres años en el estado, el cual fue diagnosticado con leishmaniasis al presentar signos clínicos como baja de peso, hiporexia, problemas visuales (provocaban una disminución en su capacidad visual) y cutáneos (eritema, alopecia, costras y escoriaciones), además de crecimiento excesivo de uñas. Después del diagnóstico, se le practicó eutanasia, seguido a ello una necropsia de la cual, a partir de esta, se realizaron frotis de bazo, hígado, ganglio linfático y medula ósea. En todos los frotis realizados se observaron amastigotes de *Leishmania* spp. lo que permitió concluir que el perro se encontraba infectado antes de llegar a México. (Zarate-Ramos *et al.*, 2007).

Nuestro estudio no reveló infección natural en las poblaciones de caninos domésticos en los diferentes municipios donde se llevó a cabo el muestreo, sin embargo, se tiene registro de la presencia de *Leishmania* spp. en animales silvestres. Rodríguez-Rojas *et al.* (2017) reportaron el primer hallazgo de infección por *Leishmania mexicana* en roedores silvestres en el noreste de México. Las tasas de infección variaron entre especies de roedores y localidad, por ejemplo, *Peromyscus eremicus*, *Peromyscus leucopus*, *Peromyscus maniculatus* y *Stenopus hispidus* fueron las especies más abundantes en el municipio de Cadereyta Jiménez y resultaron positivos a *Leishmania* spp.

Al norte del país, en Sinaloa, ya se han reportado casos de leishmaniasis canina autóctona en perros domésticos infectados por *L. mexicana*, la detección se llevó a cabo por PCR (Castillo-Ureta *et al.*, 2019). También, se han detectado *L. braziliensis*, *L. infantum* y *L. mexicana* en perros por ELISA en Yucatán (López-Céspedes *et al* 2012). En Querétaro un perro proveniente de España fue diagnosticado con Leishmaniasis luego de que el dueño observara sangrado constantemente en las almohadillas plantares, así como onicogripos, se tomaron frotis del nódulo y ganglios linfáticos en los que observaron la presencia de amastigotes, además se tomaron muestras de piel, riñón, corazón, bazo y ganglios linfáticos para el análisis molecular por PCR (Chávez-Gris *et al.*, 2023). Reyes-Novelo *et al.*, (2023) mencionan una seroprevalencia para *Leishmania* spp. que oscila entre 6.6 % y 16.4 % en el estado de Yucatán.

Algo que se suma a la problemática de detección de *Leishmania* spp. es que muchos hospederos incluyendo los perros, pueden pasar mucho tiempo sin mostrar signos clínicos, teniendo una apariencia sana (Esteva y de León, 2017), lo cual se convierte en un factor de riesgo ya que los flebotominos sin alimentar se sienten atraídos por los hospederos que ya están infectados, debido a los compuestos volátiles que emiten como heptadecano, nonanal, decanal y tetradecano, los cuales se han reportado en el pelo de perro encontraron (Magalhães-Junior *et al.*, 2014; Magalhães-Junior *et al.*, 2019).

Con respecto a los vectores de *Leishmania* en Nuevo León, se analizaron flebotominos y se menciona que, al encontrar especies de importancia médica, aunque no estén infectadas, estos pueden convertirse en un factor de riesgo para la propagación del parásito puesto que se ha encontrado infección en animales silvestres (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2017). Entre las especies de flebotominos capturadas en esta investigación en Nuevo León, se encuentran *Lutzomyia cruciata*, *Micropygomyia vindicator*, *Psathyromyia cratifer* y *Psathyromyia texana*. *L. cruciata* y *P. cratifer* son especies de importancia médica por ser vectores de *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. panamensis* (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2023; Ibañez-Bernal y Rebollar-Téllez, 2023).

Los reportes de flebotominos en el estado provienen de diferentes municipios como Cadereyta Jiménez, Linares, Santiago, Escobedo, las especies en mayor abundancia capturadas fueron *Lu. texana* y *Lu. diabolica* (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2017), Guadalupe (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2024), General Zuazua (Rebollar-Téllez *et al.*, 2023) reportaron cinco especies en este municipio *Dampfomyia anthophora*, *Psathyromyia texana*, *Micropygomyia apache* y *Micropygomyia californica*, las variables ambientales como temperatura, humedad relativa y velocidad del viento no fueron relacionadas con la abundancia de flebotominos y la especie en mayor abundancia fue *Lutzomyia diabolica*.

En esta investigación el municipio donde se capturaron más ejemplares de flebotominos fue Allende, la especie *Psathyromyia texana* fue la más abundante. Si bien ya existen reportes de *P. texana* en el estado, estos resultados representan nuevos reportes a nivel municipio para esta especie, así como para el municipio de Montemorelos. Así mismo, la especie *Psathyromyia cratifer*, *Lutzomyia cruciata* y *Micropygomyia vindicator* no habían sido reportadas en este municipio. Las trampas que utilizamos fueron la trampa Shannon y la trampa de luz CDC. Galati *et al.*, (2001) observaron una preferencia de los flebotominos por posarse en trampas Shannon de color negro.

Una de las problemáticas cuando hablamos de enfermedades desatendidas como leishmaniasis y Chagas, es la poca información que se le brinda la población, aún y cuando sea población de riesgo, un estudio en Texas, EUA realizado por Gunter *et al.* (2019) evidencia la brecha en el conocimiento sobre la enfermedad de Chagas en la población de cazadores estudiada, pues solo el 40 % (347/3855) de los participantes mencionaron haber escuchado sobre la enfermedad antes de contribuir en el estudio.

Los pilares para el control de estas enfermedades son el diagnóstico, tratamiento y la atención, sin embargo, aún existen barreras importantes en estas áreas lo que provoca un número de reportes de casos inciertos. El concepto de Una Salud también integra la vigilancia y la participación ciudadana, a pesar de esto, las dificultades impuestas por los movimientos migratorios es una gran área de

oportunidad a tratar, puesto que ello puede mejorar el acceso a la atención integral de la salud (Sousa *et al.*, 2024).

Vista la situación desde Una Salud, el sacrificio de animales en este caso perros domésticos como manera de control de las enfermedades es algo que resulta inútil (Ferreira *et al.*, 2018)). Con el enfoque de Una Salud para prevenir la infección zoonótica por *Leishmania* spp. en animales y humanos, miembros del Foro Mundial CVDB plantean recomendaciones como que los animales de compañía deben protegerse de las picaduras de los vectores, mejorar el estado de salud general y nutricional de los perros, así como mejorar las condiciones ambientales y de vivienda (Dantas-Torres *et al.*, 2019).

Cabe destacar que el diagnóstico y tratamiento no debe estar solo dirigido a los humanos, sino a los demás huéspedes involucrados en la transmisión de enfermedades domesticas como es el caso del perro doméstico, esto encaja dentro del concepto Una Salud: “el esfuerzo colaborativo de múltiples disciplinas para obtener una salud óptima para las personas, los animales y nuestro medio ambiente” (Quaresma *et al.*, 2023).

9. CONCLUSIONES

Las muestras de sangre de perro (n= 300) y los flebotominos (n= 25) salieron negativos al parásito *Leishmania* mediante la técnica molecular de PCR. Las especies de flebotominos encontradas fueron *Lutzomyia cruciata*, *Micropygomyia vindicator*, *Psathyromyia cratifer* y *Psathyromyia texana*.

Se localizó una muestra de sangre de perro positiva (1/300, 0.33%) para *T. cruzi*, lo que indica la presencia del parásito en poblaciones de perros domésticos en Nuevo León.

Se diagnosticó por medio de qPCR la presencia de *T. cruzi* en *T. gerstaeckeri* en el estado de Nuevo León, mientras que los DTUs fueron TcI y TcIII. Los ejemplares positivos fueron del municipio de Gral. Bravo y Lampazos, respectivamente.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abras, A., Gállego, M., Llovet, T., Tebar, S., Herrero, M., Berenguer, P., Ballart, C., Martí, C., & Muñoz, C. (2016). Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease: Is It Time for a Change?. *Journal of clinical microbiology*, 54(6), 1566–1572. <https://doi.org/10.1128/JCM.00142-16>
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004349.
- Alcolea, P. J., Alonso, A., Molina, R., Jiménez, M., Myler, P. J., & Larraga, V. (2019). Functional genomics in sand fly-derived *Leishmania* promastigotes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007288. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007288>
- Alemayehu, B., & Alemayehu, M. (2017). Leishmaniasis: a review on parasite, vector and reservoir host. *Health Science Journal*, 11(4), 1.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., y Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57, 1–88. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X)
- Antoniou, M., Gramiccia, M., Molina, R., Dvorak, V., y Volf, P. (2013). The role of indigenous phlebotomine sandflies and mammals in the spreading of leishmaniasis agents in the Mediterranean region. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 18(30), 20540. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.30.20540>
- Arce-Fonseca, M., Carrillo-Sánchez, S. C., Molina-Barrios, R. M., Martínez-Cruz, M., Cedillo-Cobián, J. R., Henao-Díaz, Y. A., y Rodríguez-Morales, O. (2017). Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in domestic dogs from Sonora, México. *Infectious Diseases of Poverty*, 6(1), 120. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0333-z>
- Arjona J, G., Zaragoza V, M., Zaragoza V, C., García Herrera, R., Sánchez M, M., Santamaria M, E., y Cruz B, L. (2017). Antibodies of *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* and *Leishmania braziliensis* in domiciled dogs in Tabasco, Mexico. *Revista MVZ Córdoba*, 22(2), 5829-5836.
- Barr S. C. (2009). Canine Chagas' disease (American trypanosomiasis) in North America. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 39(6), 1055–vi. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.06.004>

- Bates, P. (2007). Transmisión de promastigotes metacíclicos de *Leishmania* por flebótomos. *Revista internacional de parasitología*, 37 (10), 1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>
- Becker I., Salaiza N., Aguirre M., Kobe-Gutierrez L. y Ruiz-Hernandez J. (2008). Leishmaniosis. Becerril M. A. (Ed). *Parasitologia Medica* (58-64). editorial Mc Graw Hill
- Boecken, G., Sunderkötter, C., Bogdan, C., Weitzel, T., Fischer, M., Müller, A., Löbermann, M., Anders, G., von Stebut, E., Schunk, M., Burchard, G., Grobusch, M., Bialek, R., Harms-Zwingenberger, G., Fleischer, B., Pietras, M., Faulde, M. & Erkens, K. (2011), Diagnosis and therapy of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis in Germany. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 9: 1-51. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0379.2011.07820.x>
- Busselman, R. E., Meyers, A. C., Zecca, I. B., Auckland, L. D., Castro, A. H., Dowd, R. E., Curtis-Robles, R., Hodo, C. L., Saunders, A. B., & Hamer, S. A. (2021). High incidence of *Trypanosoma cruzi* infections in dogs directly detected through longitudinal tracking at 10 multi-dog kennels, Texas, USA. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(11), e0009935. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009935>
- Carrillo-Peraza, J. R., Manrique-Saide, P., Rodríguez-Buenfil, J. C., Escobedo-Ortegón, J. F., Rodríguez-Vivas, R. I., Bolio-González, M. E., ... y Sauri-Arceo, C. H. (2014). Estudio serológico de la Tripanosomiasis Americana y factores asociados en perros de una comunidad rural de Yucatán, México. *Archivos de medicina veterinaria*, 46(1), 75-81.
- Castillo, A., Serrano, A. K., Mikery, O. F., y Pérez, J. (2015). Life history of the sand fly vector *Lutzomyia cruciata* in laboratory conditions. *Medical and Veterinary Entomology*, 29(4), 393-402.
- Castillo-Ureta, H., Zazueta-Moreno, J. M., Rendón-Maldonado, J. G., Torres-Avenidaño, J. I., López-Moreno, H. S., Olimón-Andalón, V., ... y Torres-Montoya, E. H. (2019). First report of autochthonous canine leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) mexicana* in Sinaloa, Mexico. *Acta tropica*, 190, 253-256.
- Castrejón, O. V., Sánchez, B. R., Saldaña, A. M., y Hobart, O. (2009). Leishmaniasis cutánea de perros en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 29(4), 135-140.
- Chaves, LF, Meyers, AC, Hodo, CL, Sanders, JP, Curtis-Robles, R., Hamer, GL y Hamer, SA (2023). Infección por *Trypanosoma cruzi* en perros a lo largo de la frontera entre Estados Unidos y México: cambios de R0 con la composición de especies de vectores. *Epidemias*, 45, 100723.

- Chávez-Gris, G., García-Sánchez, L. C., Hernández-Reyes, A. L., Maldonado-Castro, E., Torres-Ramos, E., Garcés-Juárez, C., ... & Cañeda-Guzmán, I. C. (2023). Reporte de un caso de leishmaniasis canina cutánea y visceral en Querétaro, México. *Revista Biomédica*, 34(1), 94-98.
- Cecílio, P., Cordeiro-da-Silva, A., & Oliveira, F. (2022). Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. *Communications Biology*, 5(1), 305.
- Chacha, V., & Iván, J. (2022). Estudio de la enfermedad de chagas (*Trypanosoma cruzi*) en perros y su repercusión en la salud pública (Bachelor's thesis, BABAHOYO: UTB, 2022).
- Connors, E. E., Ordoñez, T. L., Cordon-Rosales, C., Casanueva, C. F., Miranda, S. M., & Brouwer, K. C. (2017). Chagas disease infection among migrants at the Mexico/Guatemala border. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(4), 1134.
- Curtis-Robles, R., Zecca, IB, Roman-Cruz, V., Carbajal, ES, Auckland, LD, Flores, I., ... & Hamer, SA (2017). *Trypanosoma cruzi* (agente de la enfermedad de Chagas) en poblaciones simpátricas de humanos y perros en “colonias” del bajo Valle del Río Grande de Texas. *Revista Estadounidense de Medicina e Higiene Tropical*, 96 (4), 805.
- Dantas-Torres, F., Miró, G., Baneth, G., Bourdeau, P., Breitschwerdt, E., Capelli, G., Cardoso, L., Day, M. J., Dobler, G., Ferrer, L., Irwin, P., Jongejan, F., Kempf, V. A. J., Kohn, B., Lappin, M., Little, S., Madder, M., Maggi, R., Maia, C., Marcondes, M., ... Otranto, D. (2019). Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. *Emerging infectious diseases*, 25(12), 1–4. <https://doi.org/10.3201/eid2512.190164>
- de Sousa, A. S., Vermeij, D., Ramos, A. N., Jr, & Luquetti, A. O. (2024). Chagas disease. *Lancet* (London, England), 403(10422), 203–218. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01787-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01787-7)
- Duthie, M. S., Lison, A., & Courtenay, O. (2018). Advances toward Diagnostic Tools for Managing Zoonotic Visceral Leishmaniasis. *Trends in parasitology*, 34(10), 881–890. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.07.012>
- Eloy, L.J., y Lucheis, S.B. (2009). Canine trypanosomiasis: etiology of infection and implications for public health. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 15, 589-611. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992009000400002>
- Estrada-Franco, J. G., Bhatia, V., Diaz-Albiter, H., Ochoa-Garcia, L., Barbabosa, A., Vazquez-Chagoyan, J. C., Martinez-Perez, M. A., Guzman-Bracho, C., y Garg, N. (2006). Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerging infectious diseases*, 12(4), 624–630. <https://doi.org/10.3201/eid1204.050450>

- Esteva, L., Vargas, C., y de León, C.V. (2017). El papel de los asintomáticos y los perros en la propagación de la leishmaniasis. *Biociencias matemáticas*, 293, 46-55.,
- Fernández Salas, I. (1987). *Biología de los triatomíneos vectores de Trypanosoma cruzi en el norte de Nuevo León, México* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Ferreira, G. R., Castelo Branco Ribeiro, J. C., Meneses Filho, A., de Jesus Cardoso Farias Pereira, T., Parente, D. M., Pereira, H. F., Carlos da Silva, J., Zacarias, D. A., Vieira da Silva, L., Medeiros Faustino, S. K., Almeida Neto, W. S., Costa, D. L., Lopes de Mendonça, I., & Nery Costa, C. H. (2018). Human Competence to Transmit *Leishmania infantum* to *Lutzomyia longipalpis* and the Influence of Human Immunodeficiency Virus Infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 98(1), 126–133. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0883>
- Galaviz-Silva, L., Mercado-Hernández, R., Zárate-Ramos, J. J., y Molina-Garza, Z. J. (2017). Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and small mammals in Nuevo León, Mexico. *Revista Argentina de microbiología*, 49(3), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.006>
- Galati, E. A., Nunes, V. L., Dorval, M. E., Cristaldo, G., Rocha, H. C., Gonçalves-Andrade, R. M., & Naufel, G. (2001). Attractiveness of black Shannon trap for phlebotomines. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5), 641–647. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762001000500008>
- Garcia, M. N., Burroughs, H., Gorchakov, R., Gunter, S. M., Dumonteil, E., Murray, K. O., & Herrera, C. P. (2017). Molecular identification and genotyping of *Trypanosoma cruzi* DNA in autochthonous Chagas disease patients from Texas, USA. *Infection, genetics and evolution*, 49, 151-156.
- García Sánchez, L. T., Aguilar Jiménez, J. R., Bueno, M. Y., Moreno Moreno, E. M., Ramírez, H., & Daza, N. (2021). Disagreement between PCR and serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors from a Colombian endemic region. Desacuerdo entre la PCR y la serología en el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* en donantes de una región endémica de Colombia. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 41(Supl. 1), 47–59. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5441>
- Gautam, A. (2022). Aislamiento de ADN por Método Chelex. En *Técnicas de aislamiento de ADN y ARN para no expertos* (págs. 79-84). Cham: Editorial Internacional Springer.
- Gluezn, E., Wheeler, R. J., Hughes, L., & Vaughan, S. (2015). Scanning and three-dimensional electron microscopy methods for the study of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana* flagella. *Methods in cell biology*, 127, 509–542. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2014.12.011>

- Grosskelwing, E. S. (2020). Tres casos de infección aguda por *Trypanosoma cruzi* en perros de Misantla, Veracruz, México. *Clínica veterinaria: abordaje diagnóstico y terapéutico*, 6. <https://doi.org/10.22201/fmvz.23958766e.202056>
- Guadalupe, V. L. D., Martha, B. T., Margarita, C. B., Elia, T. G., Adelina, S. G. M., Adrián, P. V., & María, S. S. P. (2021). Chagas' disease among school students from Chiapas, Mexico: Two cases of Chagasic cardiomyopathy. *Journal of Vector Borne Diseases*, 58(2), 148-153.
- Gunter, S. M., Ronca, S. E., Sandoval, M., Coffman, K., Leining, L., Gorchakov, R., Murray, K. O., & Nolan, M. S. (2020). Chagas Disease Infection Prevalence and Vector Exposure in a High-Risk Population of Texas Hunters. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 102(2), 294–297. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0310>
- Harms E, Gochman N, Schneider JA (1981) Lysosomal pool of free-amino acids. *Biochem Biophys Res Commun* 99(3):830–836
- Ibáñez-Bernal, S., & Duran-Luz, J. (2022). An actualized catalogue of the Psychodidae (Diptera) of Mexico and their known distribution by state. *Zootaxa*, 5104(3), 347-408.
- Ibáñez-Bernal, S. I. (2005a). Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. V.-Clave ilustrada para la identificación de los machos de *Lutzomyia* França. *Folia Entomológica Mexicana*, 44(1), 49-66.
- Ibáñez-Bernal, S. I. (2005b). Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. VI. Clave ilustrada para la identificación de las hembras de *Lutzomyia* França. *Folia Entomológica Mexicana*, 44(2), 195-212.
- Ibáñez-Berna, S., y Rebollar-Téllez, E. (2023). Estado actual del conocimiento de los hábitos hematófagos de los Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México y sus implicaciones zoonóticas. *Revista Biomedica*, 34(1), 32-43.
- Iniesta-Romero, M. G., Guzmán, L. F. D. J., Pérez-Enriquez, J. M., Castañeda-Corral, J. J., Mendez-Bernal, A., y Vazquez-Briones, D. B. (2019). Leishmaniasis canina: diagnóstico y manejo terapéutico. *Clínica veterinaria: abordaje diagnóstico y terapéutico*, 5.
- Joselín, D. V., Ignacio, M., Ángel, R. M., Gabriel, G. G., Isaias, L. V. R., Víctor, S. C., ... & Bertha, E. (2021). Multiple discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* infect sylvatic *Triatoma dimidiata* and *Panstrongylus rufotuberculatus* in Southeast Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(4), 1042.
- Kjos, S. A., Snowden, K. F., Craig, T. M., Lewis, B., Ronald, N., y Olson, J. K. (2008). Distribution and characterization of canine Chagas disease in

- López-Céspedes, A., Longoni, S. S., Sauri-Arceo, C. H., Sánchez-Moreno, M., Rodríguez-Vivas, R. I., Escobedo-Ortegón, F. J., ... & Marín, C. (2012). *Leishmania* spp. epidemiology of canine leishmaniasis in the Yucatan Peninsula. *The Scientific World Journal*, 2012.
- Martínez-Ibarra, J. A., Galavíz-Silva, L., Campos, C. L., & Trujillo-García, J. C. (1992). Distribution of triatomine bugs associated with human dwellings in the municipality of General Terán, Nuevo León, Mexico.
- Martínez-Pérez, G. E., Martínez-Tovar, J. G., Dávila-Barbosa, J. A., Rodríguez-Sánchez, I., de Lourdes Ramírez-Ahuja, M., Hernández-Cabrera, F., ... & Rebollar-Téllez, E. A. (2023). New records of triatomines (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the municipality of General Zuazua, Nuevo León, México. *Revista Biomédica*, 34(3), 272-279.
- Martínez-Tovar, J. G., Rodríguez-Rojas, J. J., Arque-Chunga, W., Lozano-Rendón, J. A., Ibarra-Juárez, L. A., Dávila-Barboza, J. A., ... y Rebollar-Téllez, E. A. (2013). Nuevos registros geográficos y notas de infección de *Triatoma gerstaeckeri* (Stål) y *Triatoma rubida* (Uhler) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) en Nuevo León y Coahuila, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 29(1), 227-233.
- Magalhães-Junior, JT, Mesquita, PRR, Oliveira, WFDS, Oliveira, FS, Franke, CR, Rodrigues, FDM, ... & Barrouin-Melo, SM (2014). Identificación de biomarcadores en pelo de perros: nuevas posibilidades diagnósticas en el estudio y control de la leishmaniasis visceral. *Química analítica y bioanalítica*, 406, 6691-6700.
- Magalhães-Junior, JT, Oliva-Filho, ADA, Novais, HO, Mesquita, PRR, M. Rodrigues, F., Pinto, MC y Barrouin-Melo, SM (2019). Atracción del flebótomo *Lutzomyia longipalpis* hacia posibles compuestos biomarcadores de perros infectados con *Leishmania infantum*. *Entomología médica y veterinaria*, 33 (2), 322-325.
- Melo, R. D. F. P., Guarneri, A. A., & Silber, A. M. (2020). The influence of environmental cues on the development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae vector. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 27.
- Minoli Sebastian A. (2004). Caracterización de hábitats naturales de triatominos (Heteroptera: Reduviidae): influencia de la temperatura, la humedad relativa y la luz en su distribución espacial. [Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires]. Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir <http://digital.bl.fcen.uba.ar>.

- Molina-Garza, Z. J., Mercado-Hernández, R., Molina-Garza, D. P., y Galaviz-Silva, L. (2015). *Trypanosoma cruzi* -infected *Triatoma gerstaeckeri* (Hemiptera: Reduviidae) from Nuevo León, México, and pathogenicity of the regional strain. *Biomédica*, 35(3), 372-378.
- Murillo-Solano, C., López-Domínguez, J., Gongora, R., Rojas-Gullosa, A., Usme-Ciro, J., Perdomo-Balaguera, E., ... & Dumonteil, E. (2021). Diversity and interactions among triatomine bugs, their blood feeding sources, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* in the Sierra Nevada de Santa Marta in Colombia. *Scientific Reports*, 11(1), 12306.
- Nolan, M. S., Aguilar, D., Brown, E. L., Gunter, S. M., Ronca, S. E., Hanis, C. L., & Murray, K. O. (2018). Continuing evidence of Chagas disease along the Texas-Mexico border. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(11), e0006899.
- Organización Panamericana de la Salud- PAHO. Leishmaniasis. (2014)
- Organización Mundial de la Salud- OMS. Leishmaniasis cutánea. Américas. OMS. (2018)
- Organización Mundial de la Salud- OMS. Leishmaniasis. Américas. OMS. (2020)
- Organización Mundial de la Salud- OMS. Leishmaniasis [en línea]. OMS. (2016)
- Organización Panamericana de la Salud. Sistema de Información Regional de Leishmaniasis en las Américas (SisLeish). Washington, DC: OPS; 2022.
- Organización Panamericana de la Salud. Sistema de información regional de leishmaniasis (SisLeish) Washington, D.C.: OPS; 2023
- Organización Panamericana de la Salud. Principales Triatominos Domiciliados de México Washington, D.C.: OPS;2022
- Organización Panamericana de la Salud. Guías para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. 2023. <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/49653/9789275120439eng.pdf?sequence=6&isAllowed=y>
- Pérez Zumaya, R. I. (2021). Determinación molecular de *Leishmania* spp. en caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) dentro de la zona de influencia de la Reserva de la Biósfera “Montes Azules” en el estado de Chiapas, México (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Peña Sánchez, A. (2019). Enfermedad de chagas en perros: una revisión.

- Pimenta, P. F., Turco, S. J., McConville, M. J., Lawyer, P. G., Perkins, P. V., & Sacks, D. L. (1992). Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, 256(5065), 1812-1815.
- Quaresma, P. F., Martins-Duarte, E. S., & Soares Medeiros, L. C. (2023). Editorial: One Health Approach in Zoonosis: strategies to control, diagnose and treat neglected diseases. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1227865. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1227865>
- Ramos, J. J. Z., Tovar, L. E. R., Ramírez, R. Á., Meléndez, J. A. S., y Pérez, F. I. F. (2007). Descripción de un caso clínico de leishmaniosis canina en el norte de México. *Veterinaria México*, 38(2), 231-240
- Ramírez, JD, Cao, L., Cruz-Saavedra, L., Hernandez, C., Castañeda, S., Muñoz, M., ... & Paniz-Mondolfi, A. (2022). PCR en tiempo real en varias etapas para la cuantificación de cargas parasitarias de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre. *Revista Internacional de Enfermedades Infecciosas*, 122, 310-312.
- Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, 58, 227-250.
- Rebollar-Téllez, EA, Martínez-Pérez, GE, & Ibáñez-Bernal, S. (2023). Notas ecológicas y nuevos registros de flebotomos1 de General Zuazua, Nuevo León, México. *Entomólogo del suroeste*, 48 (1), 97-112.
- Reyes-Novelo, E., Sauri-Arceo, C., Panti-May, A., Marín, D., Canché-Pool, E. B., Chan-Espinoza, D. E., Marín, C., Bolio-González, M., Rodríguez-Vivas, R. I., Torres-Castro, M., & Escobedo-Ortegón, F. J. (2023). Exposure to *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* parasites in dogs from a rural locality of Yucatan, Mexico. A serological survey. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, 44, 100911. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100911>
- Reineta, WF (1970). La biología y la capacidad vectorial de *Triatoma sanguisuga* texana Userer y *Triatoma gerstaeckeri* (Stål) en comparación con *Rhodnius prolixus* (Stål) (Hemiptera: Triatominae). *Revista de Entomología Médica*, 7 (1), 30-45.
- Rodgers, M. R., Popper, S. J., & Wirth, D. F. (1990). Amplification of kinetoplast ADN as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental parasitology*, 71(3), 267-275.
- Rodríguez, F., Luna, BS, Calderón, O., Manríquez-Román, C., Amezcua-Winter, K., Cedillo, J., ... & Maldonado, RA (2021). Vigilancia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en vectores triatomíneos, perros y gatos salvajes y animales salvajes en el condado de El Paso, Texas y Nuevo México y sus

alrededores. PLoS enfermedades tropicales desatendidas, 15 (2), e0009147.

- Rodríguez-Rojas, J. J., Rodríguez-Moreno, Á., Berzunza-Cruz, M., Gutiérrez-Granados, G., Becker, I., Sánchez-Cordero, V., Stephens, C. R., Fernández-Salas, I., & Rebollar-Téllez, E. A. (2017). Ecology of phlebotomine sandflies and putative reservoir hosts of leishmaniasis in a border area in Northeastern Mexico: implications for the risk of transmission of *Leishmania mexicana* in Mexico and the USA. *Écologie des phlébotomes et hôtes putatifs de la leishmaniose dans une zone frontalière du nord-est du Mexique: implications pour le risque de transmission de Leishmania mexicana au Mexique et aux États-Unis. Parasite (Paris, France)*, 24, 33. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017034>
- Rodríguez-Rojas, JJ, Lozano-Sardaneta, YN, Fernández-Salas, I., Sánchez-Casas, RM, & Becker, I. (2024). Diversidad de especies, código de barras, detección de patógenos y patrón de alimentación de sangre en Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) del noreste de México. *Acta Trópica*, 249, 107064.
- Rosete-Ortíz, D., del Socorro Berzunza-Cruz, M., Salaiza-Suazo, N. L., González, C., Treviño-Garza, N., Ruiz-Remigio, A., ... y Becker, I. (2011). Canine leishmaniasis in Mexico: the detection of a new focus of canine leishmaniasis in the state of Guerrero correlates with an increase of human cases. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 68(2), 88-93.
- Ruiz-Sánchez, R., León, M. P. D., Matta, V., Reyes, P. A., López, R., Jay, D., & Monteón, V. M. (2005). Trypanosoma cruzi isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to Trypanosoma cruzi I. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 281-283.
- Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., Alba-Alvarado, M. C. D., Castillo-Saldaña, D. R., Zenteno-Galindo, E. A., ... y Perera-Salazar, M. G. (2016). Enfermedad de Chagas en México. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 59(3), 6-16.
- Salazar Grosskelwing, E., Bolio González, M. E., Rodríguez Vivas, R. I., Miró Corrales, G., Escobedo Ortégón, F. J., Ruíz Piña, H. A., y Loría Cervera, E. N. (2020). Frecuencia serológica y molecular de *Leishmania* spp y *Trypanosoma cruzi* y factores asociados en perros con signos sugestivos de infección por tripanosomátidos en Quintana Roo, México. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(4).
- Sánchez-Saldaña, L., Sáenz-Anduaga, E., Pancorbo-Mendoza, J., Zegarra-Del-Carpio, R., Garcés-Velasco, N., y Regis-Roggero, A. (2015). Educación Médica continua. *Dermatología Peruana*, 25(3), 164-172.

- Sandoval-Ruiz, C. A., Cervantes-Peredo, L. U. I. S., Mendoza-Palmero, F. S., y Ibanez-Bernal, S. (2012). The Triatominae (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae) of Veracruz, Mexico: geographic distribution, taxonomic redescrptions, and a key. *Zootaxa*, 3487(1), 1-23.
- Santos-Gomes G, Campino L, Abranches P. Canine Experimental Infection: Intrademal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95: 193-198.
- Santos, É., & Menezes Falcão, L. (2020). Chagas cardiomyopathy and heart failure: From epidemiology to treatment. *Revista portuguesa de cardiologia*, 39(5), 279–289. <https://doi.org/10.1016/j.repc.2019.12.006>
- Schijman A. G. (2018). Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, 184, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.019>
- Secretaria de Salud. (2015). Manual de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas.http://cnts.salud.gob.mx/descargas/ManualDX_TxEnfermedadC HAGAS2015.pdf
- Secretaria de Salud. (2015). Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de las leishmaniasis. <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/ManualLeishmaniasis2015.pdf>
- Secretaria de salud. (2019). Manual de procedimientos para la enfermedad de Chagas en México.https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual_de_Procedimientos_para_la_Enfermedad_de_Chagas_en_Mexico.pdf
- Secretaria de salud (2023). Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información.
- Shelly, E. M., Acuna-Soto, R., Ernst, K. C., Sterling, C. R., and Brown, H. E. (2016). A Critical Assessment of Officially Reported Chagas Disease Surveillance Data in Mexico. *Public Health Rep.* 131(1):59-66.
- <https://doi.org/10.1177/003335491613100112>
- Sturm, N. R., Degraeve, W., Morel, C., & Simpson, L. (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Molecular and biochemical parasitology*, 33(3), 205-214.
- Tenney, T. D., Curtis-Robles, R., Snowden, K. F., & Hamer, S. A. (2014). Shelter dogs as sentinels for *Trypanosoma cruzi* transmission across Texas. *Emerging infectious diseases*, 20(8), 1323.

- Torrecilha, RBP, Utsunomiya, YT, Bosco, AM, Almeida, BF, Pereira, PP, Narciso, LG, ... & Ciarlini, PC (2016). Correlaciones entre la carga parasitaria periférica y las alteraciones clínicas y de laboratorio comunes en perros con leishmaniasis visceral. *Medicina veterinaria preventiva*, 132, 83-87.
- Travi, B. L. (2019). Considering dogs as complementary targets of Chagas disease control. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 19(2), 90-94.
- Truyens, C., Dumonteil, E., Alger, J., Cafferata, M. L., Ciganda, A., Gibbons, L., Herrera, C., Sosa-Estani, S., & Buekens, P. (2021). Geographic Variations in Test Reactivity for the Serological Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. *Journal of clinical microbiology*, 59(12), e0106221. <https://doi.org/10.1128/JCM.01062-21>
- Van Bockstal, L., Hendrickx, S., Maes, L., & Caljon, G. (2020). Sand Fly Studies Predict Transmission Potential of Drug-resistant Leishmania. *Trends in parasitology*, 36(9), 785–795. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.06.006>
- 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. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, 22, 100459. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100459>
- Zárate-Ramos, J. J., Rodríguez-Tovar, L. E., Ávalos-Ramírez, R., Salinas-Meléndez, J. A., & Flores-Pérez, F. I. (2007). Description of a canine leishmaniasis clinical case in the north of Mexico. *Veterinaria México*, 38(2): 231-240.
- Zavala-Castro, J. E. (2008). Enfermedad de Chagas y otras trypanosomosis. Becerril M. A. (Ed). *Parasitología Medica* (66-76). editorial Mc Graw Hill
- Zilberstein, D (2018) Nutrient transport and sensing as pharmacological targets for leishmaniasis. In: Rivas L, Carmen G (eds) *Drug discovery for leishmaniasis*, Drug discovery, vol 60. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp 282–296 2.

ANEXO 1



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN CIENCIAS DE LA SALUD

Carta de Consentimiento Informado

Proyecto: "Detección molecular de *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi* en perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) y vectores (Phlebotominae y Triatominae) en Nuevo León, México.

Yo _____ manifiesto que soy una persona mayor de 18 años. Vivo en el municipio de _____

Nuevo León, México. Se me ha solicitado mi autorización para la inspección de mi mascota para la búsqueda de ectoparásitos. De la misma forma autorizo y acepto que se tomen las muestras de sangre de mi mascota para fines de investigación.

Mis datos personales permanecerán bajo confidencialidad. Con mi autorización recibiré información acerca de los vectores que existen en mi vivienda, determinar si existe el riesgo de contagio de enfermedades zoonóticas, así como, acciones para prevenir o disminuir el riesgo para mí y mis mascotas.

Puedo realizar preguntas y negarme a participar en el estudio sin ningún tipo de sanción.

Investigadores principales:

Dra. Rosa María Sánchez Casas
Dr. Jorge Jesús Rojas Rodríguez

Tesista:

LBG. Pilar de Jesús Salas Rodríguez

Firma del residente: _____ Fecha: _____

Firma del investigador: _____ Fecha: _____



Dr. Canseco s/n esquina Dr. J. E. González
Col. Mitras Centro, C.P. 64460
Monterrey, Nuevo León, México
Tel: (81) 1340 4370 ext. 1789

