



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

VARIACIÓN EN LOS NIVELES DE INFECCIÓN POR
Trypanosoma cruzi EN POBLACIONES DEL VECTOR SILVESTRE
Mepraia spinolai

IVÁN CÓRDOVA AGUILERA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: ALDO SOLARI

SANTIAGO, CHILE
2010

AGRADECIMIENTOS.

Quisiera agradecer a las siguientes personas que de una u otra forma han permitido la realización de este trabajo.

Profesor Dr. Aldo Solari.

Profesor Dr. Fernando Fredes.

Profesor Dr. Pedro Cattán.

Profesora Sra. Sylvia Ortiz.

Profesora Dra. Gittith Sánchez.

A Ricardo Campos, Ximena Coronado y Nicanor Villarroel.

Esta memoria de título fue financiada por proyecto FONDECYT N°1085154.

INDICE.

RESUMEN.....1

SUMMARY.....2

INTRODUCCIÓN.....3

REVISION BIBLIOGRÁFICA

1. *Trypanosoma cruzi*.....5

2. Vectores.....6

3. Ciclo biológico.....7

4. Enfermedad de Chagas.....7

5. Diagnóstico.....8

6. Técnica de Reacción de la Polimerasa en Cadena.....9

7. DNA kinetoplastidico como molécula diagnóstica por la técnica de PCR.....10

OBJETIVOS.....12

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Insectos.....13

2. Método de captura.....13

3. Toma de muestra	13
4. Técnica de PCR	14
5. Caracterización de las muestras positivas por PCR	15
4. Análisis de los resultados	15
RESULTADOS	
1. Recolección de insectos	16
2. Detección de <i>T. cruzi</i>	17
3. Relación entre estadio ninfal y positividad a <i>T. cruzi</i> utilizando la prueba de X^2 (Chi cuadrado) para cada localidad	20
4. Comparación de cada uno de los estadios entre las distintas localidades	20
5. Comparación entre las distintas poblaciones considerando todos los estadios ...	21
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria humana grave en América, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae. La detección de *T. cruzi* puede llevarse a cabo a través de diferentes metodologías como la observación directa al microscopio, el hemocultivo, el xenodiagnóstico y en la última década mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Pruebas moleculares con la técnica de PCR mostraron un 16,4% de infección por *T. cruzi* en insectos *Mepraia spinolai* de la Región de Atacama (Chile), un 16% en la Comuna de Til-Til (Chile) y un 44,5% en la Comuna de Colina en la Región Metropolitana (Chile). Nuestros resultados muestran algunas diferencias en los niveles de infección entre los distintos estadios ninfales, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas. Se debe destacar una nota de precaución para indicar el papel potencial de *M. spinolai* en la transmisión de *T. cruzi* en las zonas donde el nivel de infección detectado por análisis moleculares es alto.

SUMMARY

Chagas disease is a serious human parasitic disease in America that is caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, and transmitted by blood-sucking insects of the subfamily Triatominae. Detection of *T. cruzi* can be carried out through different methodologies such as direct microscopic observation, hemoculture, xenodiagnosis, and in the last decade the polymerase chain reaction. Molecular evidence showed 16.4% of *T. cruzi* infection in *Mepraia spinolai* insects from Atacama Region (Chile), 16% from Til-Til Commune (Chile) and 44.5% from Colina Commune in Metropolitana Region (Chile). Our results show some differences in the infection levels among nymphal stages, but these differences are not statistically significant. A cautionary note must be stressed to indicate the potential role of *M. spinolai* in *T. cruzi* transmission in areas where the levels of infection detected by molecular analysis is high.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una de las principales zoonosis del continente americano. Actualmente esta enfermedad, tiene una amplia distribución mundial debido a la migración de personas latinoamericanas infectadas hacia el resto del mundo, lo que ocasiona graves trastornos en salud pública. El agente etiológico de esta enfermedad es un protozoo flagelado llamado *Trypanosoma cruzi*, capaz de infectar al hombre, mamíferos domésticos o sinantrópicos como perros, gatos, cabras, ovejas, caballos y algunos mamíferos silvestres como zorros, roedores, primates, marsupiales y edentados (Lent y Wygodzinsky, 1979). Todos estos animales pueden actuar como reservorios de la enfermedad, ya que muchos de ellos no presentan sintomatología clínica. Las aves, por ejemplo, son refractarias a la infección, pero proporcionan el hábitat apropiado para la existencia del vector biológico. Esta enfermedad es transmitida principalmente a través de artrópodos triatominos hematófagos conocidos popularmente como “vinchucas” que actúan como vectores biológicos. En nuestro país existen tres especies de triatominos: *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai* y la recientemente descrita *Mepraia gajardoi* (Frías *et al.*, 1998). *T. infestans* corresponde a la especie doméstica, mientras que *M. spinolai* y *M. gajardoi* corresponden a especies silvestres endémicas de Chile (Canals *et al.*, 2000).

Existen distintos métodos para la detección de *T. cruzi*, algunos de ellos son la observación directa al microscopio, el hemocultivo y el xenodiagnóstico. En la última década, la técnica molecular más usada ha sido la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), que consiste en la amplificación de ácidos nucleicos presentes en el protozoo. Éste es un método sensible que detecta y amplifica una región variable de los minicírculos del

ADN presentes en el ADN kinetoplastídico (DNAk) de *T. cruzi*. Para la posterior visualización del producto amplificado, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio al 1% y se examina en un transiluminador con filtro de luz ultravioleta (Campos *et al.*, 2007).

En este estudio se analizaron muestras fecales de individuos silvestres de *M. spinolai*, recolectados en tres localidades del país siguiendo un gradiente latitudinal, por medio de la técnica de PCR, para determinar frecuencias de infección por *T. cruzi*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozoo de la clase Flagelata del orden Kinetoplastida y de la familia Trypanosomatidae. Éste posee una gran mitocondria (kinetoplasto) que contiene ADN organizado en una red encadenada de maxicírculos y minicírculos (De Souza, 2000). Dentro del género *Trypanosoma* se describen distintos estados morfológicos según el hospedero en que se encuentre, describiéndose las siguientes formas (Atias, 1998):

- Tripomastigote. De aspecto fusiforme, alargado y con un flagelo en el extremo anterior. Los tripomastigotes se encuentran en la sangre de mamíferos e intestino posterior de triatomíneos y corresponde a la forma infectante, pero no se multiplica.
- Epimastigote. De aspecto ovalado, con un flagelo en el extremo anterior. Se encuentra en el intestino medio de los triatomíneos donde se multiplica.
- Amastigote. Tiene forma ovalada con un flagelo no emergente, y es la forma proliferativa del parásito en las células de los hospederos vertebrados.

En Chile, esta parasitosis es adquirida principalmente a través de vectores, pudiendo además ser transmitido por vía transfusional, transplacentaria, trasplante de órganos, oral, accidentes de laboratorio y por leche materna. (Howard y Rubio, 1968; Apt y Reyes, 1986).

Con estudios isoenzimáticos se pudo demostrar que existe una gran diversidad genética de *T. cruzi*, agrupándose en tres grupos isoenzimáticos que fueron llamados zimodemos Z1, Z2, y Z3. Estudios epidemiológicos demostraron que Z1 y Z3 están principalmente asociados al ciclo silvestre, en tanto que Z2 con el ciclo doméstico (Miles *et al*, 1978).

2. Vectores

Los triatomíneos son hematófagos estrictos y hemimetábolos típicos, pasando desde el huevo y cinco estadios ninfales hasta llegar a machos y hembras adultas. En Chile, se describen tres especies de vinchucas vectores de la enfermedad de Chagas: el vector doméstico, *T. infestans*, y dos vectores silvestres, *M. spinolai* y *M. gajardoi* (Frias *et al.*, 1998). En la medida que se erradica el vector doméstico, cobran cada día más importancia los estudios en los vectores silvestres, sobre todo en áreas donde se establece contacto con el hombre como las zonas periurbanas de Santiago (Frias *et al.*, 1995).

Aparentemente el termotropismo es el mayor estímulo para alimentarse y la mayoría de las especies tardan entre 10 y 20 minutos en alimentarse hasta la repleción. Los movimientos del hospedero les molestan, por lo que es común que cada ninfa tome varias comidas pequeñas entre cada muda, aunque a veces una sola comida hasta la repleción basta para producir la muda. Los adultos pueden tomar sangre entre 2 a 4 veces su peso, mientras que las ninfas pueden alcanzar entre 8 a 9 veces su peso (Schofield, 1994; Atias, 1998).

Los datos epidemiológicos respecto del porcentaje de seres humanos infectados por vía vectorial, estiman que entre un 0,65% y 5,8% del total de los casos del país, son debido a *M. spinolai* y el promedio de infección por *T. cruzi* en este vector alcanza el 11,4%, llegando al 25,8% en la Región de Coquimbo (Ordenes *et al.*, 1996; Canals *et al.*, 1998). Sin embargo, usando herramientas diagnósticas más sensibles como PCR, se alcanzan cifras de hasta 46% (Botto-Mahan *et al.*, 2005).

3. Ciclo biológico

Los triatominos no infectados se infectan al ingerir sangre de mamíferos infectados. En el lumen del intestino medio del triatomino los parásitos se multiplican muy activamente como epimastigotes y, al cabo de 15 a 30 días, se desarrollan los tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del triatoma. Posteriormente, el triatomino infectado al momento de alimentarse de otro mamífero no infectado emite heces con tripomastigotes que al atravesar la piel por el sitio de picadura o vía mucosa infecta a éste. Es así como el insecto vector no inocula el parásito, por lo que es una transmisión vectorial posterior (estercoraria). Una vez en la sangre del mamífero, los tripomastigotes penetran en células de diferentes tejidos y se multiplican como amastigotes por fisión binaria hasta destruir la célula liberando los parásitos al torrente sanguíneo y penetrando en otras células. El ciclo se completa cuando nuevos triatominos no infectados ingieren sangre de mamíferos infectados con tripomastigotes (Schofield, 1994; Atias, 1998; De Souza, 2000).

4. Enfermedad de Chagas

Esta enfermedad posee una de las mayores mortalidades y morbilidades en Sudamérica, y se encuentra distribuida desde el sur de E.E.U.U. hasta el sur de Chile. En Chile, ha sido detectada en áreas rurales y suburbanas entre los 18° 30' y 34° 16' latitud sur correspondiente a zonas áridas y semiáridas.

En la enfermedad de Chagas sólo entre el 20-25% de los casos humanos presenta sintomatología. En la fase aguda de la enfermedad, la menos común en Chile, hay proliferación del parásito en distintas células, caracterizándose también por una alta parasitemia, aumento del volumen de los nódulos linfáticos, esplenomegalia,

hepatomegalia, meningoencefalitis y cardiomegalia por la dilatación de las cavidades del corazón. Esta fase aguda se observa en Chile sólo en niños con infección congénita.

En la fase crónica, el compromiso orgánico se centra principalmente en miocardio y tubo digestivo. En estos casos se pueden desarrollar cardiomegalias por la dilatación e hipertrofia del miocardio, en tanto que en el tubo digestivo, principalmente el esófago y el colon aparecen elongados y muy dilatados, con importante hipertrofia de su capa muscular. En esta fase, el parasitismo decae por la respuesta inmune del hospedero disminuyendo la parasitemia lo que dificulta su diagnóstico directo (Atias y Apt, 1991).

5. Diagnóstico

El diagnóstico directo de la enfermedad de Chagas crónica ha presentado problemas debido a la baja parasitemia con que habitualmente se presenta. Las técnicas más utilizadas para diagnosticar la infección por *T. cruzi* han sido las pruebas serológicas, que son muy útiles, aunque presentan baja especificidad debido a reacciones cruzadas con antígenos de otros agentes infecciosos como *Micobacterium leprae* y parásitos tripanosomatideos como *Leishmania* sp. y *T. rangeli* (Schumuñis, 1991; Guhl *et al.*, 1987).

El xenodiagnóstico, no obstante que tiene una especificidad del 100%, es de baja sensibilidad aunque superior a otras técnicas parasitológicas comunes. Su rendimiento es de sólo entre 17 y 70% del obtenido por métodos serológicos, dependiendo entre otros factores: de la etapa de infección, el número de insectos usados, la especie usada y el área geográfica (Schenone *et al.*, 1974).

La técnica de PCR utilizada para amplificar segmentos del ADN kinetoplastídico de *T. cruzi* a partir de muestras de sangre y contenido intestinal de vinchuca, en animales y humanos, ha demostrado ser sensible y exitosa lo que permite mejorar el diagnóstico de la

enfermedad en infecciones crónicas (Zulantay *et al.*, 2004; Botto-Mahan *et al.*, 2005; Rozas *et al.*, 2005).

6. Técnica de Reacción de la Polimerasa en Cadena

La técnica de PCR es un método para amplificar ácidos nucleicos. Esto se logra con la repetición de un set de tres pasos sucesivos (denaturación, alineación y elongación) bajo condiciones controladas de temperatura, que van siendo modificadas por el termociclador. Al conjunto de estas tres etapas se las denomina ciclos (Oste, 1988):

a.- Denaturación: La doble hebra de ADN usada como molde es denaturada por incubación a alta temperatura (94°C). Las dos hebras ahora disociadas permanecerán libres hasta que la temperatura baje lo suficiente para permitir la alineación o hibridación de los oligonucleótidos usados como partidores.

b.- Alineación: Los oligonucleótidos sintéticos o partidores se unen o alinean a sitios vecinos a la región a ser amplificada. Cada partidor alineará sólo una de las hebras de ADN. La secuencia de los partidores es determinada por la secuencia del ADN, en los límites de la región a ser amplificada. Cuando los partidores se alinean a hebras opuestas lo hacen enfrentando sus extremos 3'. Los partidores tienen una secuencia diferente y no son complementarios uno al otro.

Debido a que los partidores están presentes en exceso con respecto al molde de ADN, la formación del complejo partidor-hebra de ADN se ve favorecido, respecto de la reasociación de las dos hebras de ADN cuando baje la temperatura.

c.- Elongación: En este proceso los desoxirribonucleótidos de la mezcla son incorporados al producto de extensión por la ADN polimerasa termoestable. El producto amplificado de interés comienza a acumularse luego de tres ciclos y como los ciclos siguen aumentando, los amplificados empiezan a actuar como molde aumentando en forma exponencial en cada ciclo. Todo este proceso ocurre a una temperatura aproximada de 72°C (Oste, 1988).

7. ADN kinetoplastídico como molécula diagnóstica por la técnica de PCR

El ADN mitocondrial del *T. cruzi* representa cerca del 20% del ADN total. Está formado por minicírculos (1,4 kb) y maxicírculos (16,0 kb) de ADN encadenados formando una compleja red compacta (Riou y Pautrizel, 1969). Existen al menos 50 copias idénticas de maxicírculos que son similares al ADN mitocondrial de los eucariontes superiores y codifican ARN ribosomales y proteínas involucradas en la generación de ATP en la mitocondria (Simpson, 1987). Los minicírculos, en cambio, existen en un número variable entre 3.000 y 30.000 copias, pudiendo haber heterogeneidad de secuencia entre los minicírculos de cada clón de *T. cruzi*. La función de estos minicírculos es codificar transcritos llamados ARN guías, los que dirigen la modificación postranscripcional de los ARN mitocondriales, fenómeno llamado “editing” (Sturn y Simpson, 1990).

Cada minicírculo presenta cuatro regiones de secuencia altamente conservada, las cuales están regularmente distribuidas cada 90° entre sí y con un tamaño cercano a las 120 pb y representan los orígenes de la replicación de los minicírculos (Kitchin *et al.*, 1985). Además, cada minicírculo contiene cuatro regiones hipervariables con una secuencia de tamaño cercano a 250 pb, codificantes para los ARN guías, que están entre las regiones conservadas. En todos los minicírculos secuenciados de las distintas especies de

tripanosomátideos, se ha observado en la región conservada la existencia de tres bloques denominados bloques de secuencia conservada: BSC-1 (5'-AGGGGCGTTC-3'), BSC-2 (5'-CCCCGTAC-3') y BSC-3 (5'-GGGGTTGGTGTA-3'); los cuales son uniformes en sus secuencias, ordenamiento y distancia entre ellos (Ray, 1989; Sheline y Ray, 1989).

La técnica de PCR fue la de elección en este estudio por sus características de sensibilidad, que la hacen la apropiada para cumplir los objetivos de este trabajo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las frecuencias de infección por *T. cruzi* en poblaciones de *M. spinolai*, contribuyendo a aumentar el conocimiento sobre la epidemiología de este parásito en el ciclo silvestre.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detección del ADNk de *T. cruzi* mediante PCR de muestras de heces de distintas poblaciones de *M. spinolai*, y así determinar la frecuencia de infección en esta especie en tres localidades del país.
2. Comparar las frecuencias de infección según los distintos estadios del desarrollo en las poblaciones de *M. spinolai* estudiadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Insectos

Para este estudio se trabajó con uno de los triatomíneos endémicos de Chile, *M. spinolai*, que fueron capturados durante el mes de Marzo del 2008 en tres áreas del país. Se contempló alcanzar un tamaño muestral equivalente a 100 ejemplares por localidad, para aumentar la probabilidad de detectar individuos infectados si se considera que en algunas localidades los niveles de infección pueden ser inferiores a 10%. Las localidades de captura fueron Caleta Zenteno, ubicada en la comuna de Caldera (26°51'S, 70°48' W; Región de Atacama), Til Til (33°05'S, 70°55' W; Región Metropolitana) y Canteras de Colina (33°20' S, 71°30' W; Región Metropolitana). Los ejemplares capturados fueron transportados a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, donde se clasificaron según estadio ninfal y se mantuvieron individualmente en frascos plásticos dentro de una cámara de crianza con temperatura y humedad relativa controlada (27°C y 75% HR).

2. Método de captura

Se utilizó el método hombre-cebo. Este método consiste básicamente en captura manual con estrategia “*sit and wait*” en sitios pedregosos y de cantera dentro del rango de distribución de esta especie.

3. Toma de muestra

Una vez clasificados, los ejemplares fueron alimentados individualmente con roedores de laboratorio (Bioterio de la Facultad de Medicina Norte) para obtener muestras fecales. Estas muestras se diluyeron con agua bidestilada o PBS y se almacenaron a -20°C,

temperatura a la cual el protozoo muere y se conserva mejor. Esto último disminuye el riesgo biológico en el análisis de muestras en el laboratorio. A aquellos ejemplares que resultaron muertos durante su traslado o cautiverio, se les realizó una extracción del contenido intestinal que se procesa de igual forma que las muestras fecales anteriormente descritas. El resto del ejemplar fue congelado y almacenado con su correspondiente identificación.

4. Técnica de PCR

Para los análisis moleculares, las muestras de heces diluidas fueron descongeladas y hervidas durante 5 minutos, con el objeto de fragmentar en parte los minicírculos del ADNk, luego fueron centrifugadas durante 1 minuto a 10.000 rpm para su posterior uso. La mezcla de la reacción estuvo constituida por 5µl de la muestra, 3µl de los oligonucleótidos 121(5'- AAA TAA TGT ACG GGG GAG ATG CAT GA-3') y 122 (5'- GTT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA -3') a una concentración final de 25 µM, 5µl de buffer de Taq polimerasa que generó concentraciones finales de 67 mM de Tris-HCl pH 8.8, 16.6 mM de (NH₄)₂ SO₄, 6,7 mM de MgCl₂ y 10 mM 2-mercaptoetanol. El buffer contenía además 0,5 µl de seroalbúmina bovina al 1%, 5 µl (0.4mM) de los cuatro dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 4 unidades de Taq polimerasa correspondiente a 0,5 µl y agua bidestilada hasta un volumen final de 50 µl.

El procedimiento para la amplificación del ADNk de *T. cruzi* constó de 2 ciclos iniciales a 98°C durante 1 min y 64°C por 2 min; 33 ciclos intermediarios de 94°C por 1 min y 64°C por 1 min y un ciclo final a 72°C por 10 min. En cada ensayo se usó un control positivo (cepa tulahuen de *T. cruzi*), un control negativo de PCR donde el ADN de la

muestra fue reemplazado por agua destilada y un marcador de ADN. Una vez terminado el ensayo se tomaron 10 μ l del amplificado y se mezclaron con 4 μ l de buffer de carga, el marcador de peso molecular se compone de 3 μ l de buffer de carga y 2 μ l de marcador de ADN de múltiplos de 100 pares de bases.

5. Caracterización de las muestras positivas por PCR

Para la visualización del producto amplificado que posee un tamaño de 330 pb que representa la región hipervariable de los minicírculos amplificados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio al 1%, y se observaron en un transiluminador con filtro de luz ultravioleta. Una única banda por sobre un tercio del nivel de la banda de 330 pb del marcador indicó la presencia de ADNk, en consecuencia un resultado positivo a la presencia de *T. cruzi* (Botto-Mahan *et al.*, 2005).

6. Análisis de los resultados

Los análisis estadísticos contemplaron (i) comparaciones para determinar si algunos estadios ninfales están más infectados que otros, (ii) comparaciones entre las distintas localidades para cada uno de los estadios ninfales por separado y, (iii) comparaciones de las frecuencias de infección total entre las tres localidades (considerando todos los estadios ninfales). Todas las comparaciones previamente descritas se realizaron utilizando la prueba de Chi-cuadrado (análisis de tabla de contingencia) con el programa Chi-square analysis.

RESULTADOS

1. Recolección de insectos

El total de ejemplares capturados por localidad en Caleta Zenteno (26°51'S, 70°48' W; Región de Atacama), Til Til (33°05'S, 70°55' W; Región Metropolitana) y Canteras de Colina fue de 85, 100 y 128 triatomos, respectivamente. Los distintos estadíos por localidad se detallan en la Tabla 1. No se encontró ni recolectó ningún ejemplar adulto, por lo cual esta clase de edad no está representada en el cuadro 1.

Cuadro 1. Distribución etárea de los ejemplares de *Mepraia spinolai* capturados en sectores de Caleta Zenteno, Til-Til y Colina. Chile 2008.

ESTADIO NINFAL	Caleta Zenteno	Til-Til	Colina
I	17	7	9
II	25	28	27
III	36	33	65
IV	5	9	18
V	2	23	9
TOTAL	85	100	128

2. Detección de *T. cruzi*

De un total de 85 triatominos analizados provenientes de la localidad de Caleta Zenteno, se encontró un 16,47% de infección por *T. cruzi*, los distintos porcentajes de infección según estadio se detallan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Índice tripano-triatomino medido por PCR, según el estadio ninfal de los ejemplares de *Mepraia spinolai*, capturados en el sector de Caleta Zenteno de la Región de Atacama. Chile, 2008.

ESTADIO NINFAL	n	POSITIVAS	% INFECCIÓN
I	17	5	29,41
II	25	7	28
III	36	2	5,55
IV	5	0	0
V	2	0	0
TOTAL	85	14	16,47

De un total de 100 triatominos analizados provenientes de la localidad de Til-Til, se encontró un 16,0% de infección por *T. cruzi*, los distintos porcentajes de infección según estadio se detallan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Índice tripano-triatomino medido por PCR, según el estadio ninfal de los ejemplares de *Mepraia spinolai*, capturados en el sector de Til-Til de la Región Metropolitana. Chile, 2008.

ESTADIO NINFAL	n	POSITIVAS	% INFECCIÓN
I	7	3	42,85
II	28	2	7,14
III	33	4	12,12
IV	9	1	11,11
V	23	6	26,08
TOTAL	100	16	16

De un total de 128 triatominos analizados provenientes de la localidad de Colina, se encontró un 44,53% de infección por *T. cruzi* y los distintos porcentajes de infección según estadio se detallan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Índice tripano-triatomino medido por PCR, según el estadio ninfal de los ejemplares de *Mepraia spinolai*, capturados en el sector de Colina de la Región Metropolitana. Chile, 2008.

ESTADIO NINFAL	n	POSITIVAS	% INFECCIÓN
I	9	3	33,33
II	27	6	22,22
III	65	33	50,77
IV	18	9	50,00
V	9	6	66,66
TOTAL	128	57	44,53

3. Relación entre estadio ninfal y positividad a *T. cruzi* utilizando la prueba de X^2 (Chi cuadrado) para cada localidad.

Análisis estadísticos para examinar la relación entre estado de madurez y positividad a *T. cruzi* para la localidad de Colina, indica que algunos estadios ninfales tienden a estar más infectados que otros ($X^2 = 8,92$; g.l. = 4, $p = 0,063$). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

El análisis estadístico para la localidad de Til-Til, indica que los distintos estadios ninfales están igualmente infectados ($X^2 = 7,66$; g.l. = 4; $p = 0,105$).

En el caso de Caleta Zenteno, el análisis estadístico indica que algunos estadios ninfales tienden a estar más infectados que otros ($X^2 = 8,98$; g.l. = 4; $p = 0,062$). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

4. Comparación de cada uno de los estadios entre las distintas localidades.

El análisis estadístico para determinar la relación entre localidad y positividad a *T. cruzi* para los estadios I y II, comparando cada estadio entre las tres localidades en estudio, indica que estos estadios están igualmente infectados en las tres localidades ($X^2=0,4$, g.l.=2, $p=0,817$ y $X^2=4,9$, g.l.=2, $p=0,129$, respectivamente). En el caso de los estadios III y IV, los resultados indican que para estos estadios algunas localidades presentan mayores niveles de infección que otras ($X^2=29,07$, g.l.=2, $p=0,00001$ y $X^2=6,917$, g.l.=2, $p=0,0315$,

respectivamente). Para el estadio V, esta relación no fue estadísticamente significativa ($X^2=5,82$, g.l.=2, $p=0,05$).

5. Comparación entre las distintas poblaciones considerando todos los estadios.

Al comparar las frecuencias de infección total entre las tres localidades (considerando todos los estadios ninfales combinados), el análisis estadístico indica que algunas localidades, en este caso Colina, tienden a estar más infectadas que otras ($X^2=30,23$, g.l.=2, $p=0,00001$).

DISCUSIÓN

Estudios previos realizados en nuestro país, que utilizaron el método de observación directa en microscopio, reportaron una alta variabilidad en los niveles de infección de *T. cruzi* en sus vectores silvestres, desde un 0 a un 26%, dependiendo de la localidad (Apt y Reyes 1986; Frias *et al.*, 1995; Ordenes *et al.*, 1996; Canals *et al.*, 2001). Sin embargo, otra investigación realizada en la Reserva Nacional Las Chinchillas que utilizó la técnica de PCR, reportó un 46,15% de ninfas infectadas con *T. cruzi*. Este mismo estudio reveló que existían niveles similares de infección en los distintos estadios ninfales que van entre 38,3 y 54,1% (Botto-Mahan *et al.*, 2005). En la presente investigación, se alcanzaron niveles de infección de hasta 44,53% en la localidad de Colina, sin mostrar diferencias significativas en los niveles de infección de sus distintos estadios ninfales. Este resultado también coincide con resultados de un estudio realizado en Til Til, en que se menciona que la relación entre estado de madurez y positividad a *T. cruzi* para la especie *M. spinolai* no fue significativa (Bacigalupo *et al.*, 2006). Sin embargo, al comparar cada uno de los estadios ninfales entre las distintas localidades, existen diferencias estadísticamente significativas en los estadios ninfales III y IV. Este resultado podría ser explicado en parte por los pequeños tamaños muestrales de ejemplares capturados en una de las localidades. También se detectaron diferencias al comparar las frecuencias de infección total, considerando todos los estadios ninfales, entre las tres localidades.

M. spinolai presenta una distribución agregada, es decir se reúnen en determinadas zonas que presentan las mejores posibilidades y el índice de infección por *T. cruzi* es variable según sea la población (Acuña, 2002). Este vector es un hematófago oportunista, y

se ha visto que se alimenta principalmente del hospedero más abundante o del que esté presente, por ello se ha encontrado que *M. spinolai* se alimenta incluso de más de un hospedero a la vez (Molina *et al.*, 2004). Esta conducta podría explicar las diferencias de infección, que quizás se deban a las distintas estructuras en las comunidades de animales de las cuales dependen tales poblaciones (roedores, cánidos, caprinos, humanos, aves, reptiles, etc.). Por ejemplo, no es lo mismo una población de *M. spinolai* dependiente principalmente de aves o reptiles, ambos refractarios a la infección por *T. cruzi*, pero proporcionan el hábitat apropiado para la existencia del insecto vector, que otra dependiente de mamíferos que efectivamente pueden actuar como reservorios de *T. cruzi*. Adicionalmente, la época del año es un factor importante, ya que en los meses de verano aumenta el número de *M. spinolai* y el porcentaje de infección también aumenta (Acuña, 2002). Sin embargo, en este estudio se recolectaron todos los insectos en el mes de Marzo, por lo tanto no sería un factor de variación en los porcentajes de infección.

Desde el punto de vista epidemiológico, esta especie ha sido históricamente considerada como de bajo riesgo para la salud humana. Sin embargo, en esta investigación se ha reportado que un porcentaje importante de las vinchucas analizadas de la especie *M. spinolai* están infectadas con *T. cruzi*. Adicionalmente, es muy importante considerar la posibilidad de domiciliación de esta especie dado por la “invasión” del hombre a los hábitats de los triatomíneos. Desde esta perspectiva, *M. spinolai* es una especie potencialmente peligrosa, especialmente en las zonas donde se produce el contacto habitual con el hombre. Esto ocurre en las zonas de canteras y en algunas áreas de los alrededores de Santiago, donde actualmente se está urbanizando, tales como Colina, Lampa y Til-Til. En el caso de Caleta Zenteno en la Región de Atacama, son muchas las familias de

recolectores de algas que habitan en precarias condiciones acampando en zonas pedregosas y están en contacto con *M. spinolai* habitualmente.

La importancia de este estudio radica en que se demuestra que existen niveles importantes de infección por *T. cruzi* en *M. spinolai*, tanto en la localidad del norte analizada, como en las zonas periurbanas de Santiago, como lo son Colina y Tiltil. Un segundo aspecto altamente relevante es el potencial riesgo de los vectores silvestres de la enfermedad de Chagas en Chile. Por último, los resultados de esta investigación permitirán aumentar el conocimiento sobre la epidemiología de este parásito en el ciclo silvestre de transmisión de la enfermedad de Chagas en Chile.

CONCLUSIONES

Según los objetivos específicos de este estudio, fue posible detectar el kDNA de *T. cruzi* mediante PCR de muestras de heces en distintas poblaciones de *M. spinolai*, y se determinaron las frecuencias de infección en las localidades de Caleta Zenteno (26°51'S, 70°48' W; Región de Atacama), Tiltil (33°05'S, 70°55' W; Región Metropolitana) y Canteras de Colina (33°20' S, 71°30' W; Región Metropolitana). El porcentaje de positividad fue de 16,47, 16,0 y 44,53%, respectivamente.

Segundo, fue posible comparar las frecuencias de infección según los distintos estadios en las poblaciones de *M. spinolai* estudiadas, donde se concluyó que no existe relación entre estado de madurez y positividad a *T. cruzi* para la localidad estudiadas.

Al comparar cada uno de los estadios entre las distintas localidades se concluyó que para los estadios I, II y V no existen diferencias significativas, y para los estadios III y IV si se detectaron diferencias. Al analizar las frecuencias de infección total entre las tres localidades (considerando todos los estadios ninfales), la relación fue que efectivamente existen diferencias estadísticamente significativas.

BIBLIOGRAFÍA

- ACUÑA, M.** 2002. La vinchuca silvestre: ¿una amenaza latente?. [online] Tecnovet N°2 <http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9633%2526ISID%253D471,00.html > [consulta: 22-05-2009].
- APT, W.; REYES, H.** 1986. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Chile I. Distribución geográfica, índices de infección en vectores y humanos. *Parasitol. al Día*. 10:94-101.
- ATÍAS, A.; APT, W.** 1991. Enfermedad de Chagas. En Atias A.; Neghme, A. *Parasitología Clínica*. 3ª ed. Santiago de Chile. Ed. Mediterráneo. 255-258.
- ATÍAS, A.** 1998. Enfermedad de Chagas. Triatomas, Chinchas y Cucarachas. In: *Parasitología Médica*. Primera edición. Editorial Mediterráneo. Santiago. Chile. pp: 251-264; 477-483.
- BACIGALUPO, A.; SEGURA, J.; GARCIA, A.; HIDALGO, J.; GALUPPO, S.; CATTAN, P.** 2006 Primer hallazgo de vectores de la enfermedad de Chagas asociados a matorrales silvestres en la Región Metropolitana, Chile. *Rev Méd Chile*; 134: 1230-1236.
- BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ROZAS, M.; CATTAN, P.; SOLARI, A.** 2005. DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in the Chilean wild vector *Mepraia spinolai*. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz*. 100: 237-239.
- CAMPOS, R.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ACUÑA, M.; CATTAN, P.; SOLARI, A.** 2007. *Trypanosoma cruzi* detection in blood by xenodiagnosis and polymerase chain reaction in the wild rodent *Octodon degus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76 (2): 324-326.
- CANALS, M.; EHRENFELD, M.; SOLIS, R.; CRUZAT, L.; PINOCHET, A.; TAPIA, C.; CATTAN, P.** 1998. Biología comparada de *Mepraia spinolai* en condiciones de laboratorio y terreno: Cinco años de estudio. *Parasitol. al Día*. 22: 72-78.

- CANALS, M.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.** 2000. Situación de *Mepraia spinolai* vector silvestre de la enfermedad de Chagas en Chile, en relación con otros vectores desde la perspectiva de sus fuentes de alimentación. *Rev. Med. Chile.* 128: 1108–1112.
- CANALS, M.; CRUZAT, L.; MOLINA, MC.; FERREIRA, A.; CATTAN, PE.** 2001. Blood host sources of *Mepraia spinolai* (Heteroptera: Reduviidae), wild vector of Chagas disease in Chile. *J. Med. Entomol.* 38: 303-307.
- DE SOUZA, W.** 2000. O parasito e sua interacao con os hospedeiros. En *Trypanosoma cruzi* e doenca de Chagas. Brener Z. 2ªed. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. Brasil. 88–126.
- FRIAS, D.; SOLARI, A.; GONZALEZ, C.; HENRY, A.; ALVIÑA, A.** 1995. Índices de infección de *Mepraia spinolai* con *Trypanosoma cruzi*, su invasión a ambientes domésticos e interacción con *Triatoma infestans*. *Parasitol. al Día* 19: 195.
- FRIAS, D.; HENRY, A.; GONZALEZ, C.** 1998. *Mepraia gajardo* una nueva especie de triatominae (Hemiptera: Reduviidae) para Chile y su comparación con *Mepraia spinolai* (Porter, 1934). *Rev. Chil. His. Nat.* 71: 177–188.
- GUHL, F.; HUDSON, L.; MARINKELLE, C.; JARAMILLO, C.; BRIDGE, D.** 1987. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as complication of Chagas disease. *Parasitology.* 94: 475-484.
- HOWARD, J.; RUBIO, M.** 1968. Enfermedad de Chagas congenita. Estudio clínico y epidemiológico de treinta casos. *Parasitology.* 23: 107-108.
- KITCHIN, P.; KLEIN, V.; ENGLUD, P.** 1985. Intermediates in the replication of kinetoplast DNA minicircles. *J. Biol. Chem.* 260: 3844-3851.
- LENT, H.; WYGODZINSKY, P.** 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163: 123–520.
- MILES, M.A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW J.J.; LIINSON, R.; TOYE, P.J.** 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient With Chagas disease in amazonian Brazil. *Nature.* 272 (5656): 819-821.

- MOLINA, MC.; CATTAN, P.; CANALS, M.; CRUZAT, L.; AGUILLON, JC.; FERREIRA, A.** 2004. A simple immunometric assay to assess the feeding habits of *Meprai spinolai*, a *Trypanosoma cruzi* vector. Parasitol Res. 92 (5): 375-379.
- ORDENES, H.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.; CANALS, M.** 1996. Infección Tripano-triatomino de *Triatoma spinolai* en una zona de riesgo epidemiológico. Rev. Med. Chile. 124: 1053–1057.
- OSTE, C.** 1988. Polymerase chain reaction. Biotechniques. 6: 162-167.
- RAY, D. S.** 1989. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. Mol. Cell. Biol. 9: 1365-1367.
- RIOU, G.; PAUTRIZEL, R.** 1969. Nuclear and kinetoplast DNA from trypanosomae. J. Protozool. 16: 509-513.
- ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, M.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.; SOLARI, A.** 2005. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals from a chagasic area of Chile. Am. J. Trop. Med. Hyg. 73 (3): 517-519.
- SIMPSON, L.** 1987. The mitochondrial genome of kinetoplast protozoa: genomic organization, transcription; replication and evolution. Ann. Rev. Microbiol. 41: 363-382.
- SHELIN, C.; RAY, D.S.** 1989. Specific discontinuities in *Leishmania tarentolae* minicircles map within universally conserved sequence blocks. Mol. Biochem. Parasitology. 37: 151-158.
- SCHENONE, H.; ALFARO, E.; ROJAS, A.** 1974. Bases y rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica humana. Bol. Chil. Parasitol. 29: 24-30.
- SCHOFIELD, C. J.** 1994. Triatominae: Biología y Control. Eurocommunica Publications Ed. U.K. pp 76–80.
- SCHUMUÑIS, G.** 1991. *Trypanosoma cruzi* the etiologic agent of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and non endemic countries. Transfusion 31: 547-555

STURN, N.; SIMPSON, L. 1990. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Rev. Cell* 61: 879-884.

ZULANTAY, I.; HONORES, P.; SOLARI, A.; APT, W.; ORTIZ, S.; OSUNA, A.; ROJAS, A.; LOPEZ, B.; SANCHEZ, G. 2004. Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. *Diagn Micr Infec Dis.* 48: 253-257.