



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN ROEDORES CAPTURADOS EN SECTORES DE LA REGIÓN METROPOLITANA CON PRESENCIA DE FOCOS ASILVESTRADOS DE *TRIATOMA INFESTANS*

STEPHANIA GALUPPO GAETE

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : PEDRO EDUARDO CATTAN AYALA
PROFESORA CONSEJERA: ANA MARÍA RAMÍREZ
PROFESOR CONSEJERO: FERNANDO FREDES

SANTIAGO, CHILE
2007

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Revisión Bibliográfica	7
Ciclo.....	7
Clasificación de los triatominos.....	10
Los triatominos de Chile.....	11
Hospederos.....	13
Reservorios y Prevalencias de <i>T. cruzi</i>	13
Prevalencia de <i>T. cruzi</i> en mamíferos de Chile.....	18
Perfil Alimentario de los triatominos chilenos.....	22
Preferencias alimentarias de los triatominos e infección en animales.....	23
Clínica.....	25
Caracterización de <i>T. cruzi</i>	27
Diagnóstico.....	28
Objetivos	31
Material y Método	32
Resultados	36
Discusión	47
Conclusiones	53
Bibliografía	54

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi infinita gratitud a todos y cada uno de los y las que hicieron posible que pudiera llevar a buen y merecido término este trabajo.

Enumerando

Alejandra Alzamora, principal impulsora en tomar esta tesis como proyecto de título. No se me olvida tu madre Dinamarca, ¡gracias por el computador!, gracias también por tu carpeta.

José Antonio Segura y Hugo Aguiló por el apoyo y padecimiento en terreno del sol calcinante, gracias, además por la confianza depositada en mi en la realización del experimento.

Alejandro García, Javier Hidalgo y don José del laboratorio muchísimas gracias por el tiempo y la dedicación, incondicionales, por la disposición a enseñarme y por las interminables horas abocadas a la corrección y otros similares, y por estar en el momento y lugar indicados.

Antonella Bacigalupo te excediste con lo de la información, gracias por el aporte bibliográfico, gran disposición a ayudar.

Pedro Cattán, agradezco la comprensión en lo que a mis plazos académicos se refiere (no presionar y dejarme terminar los ramos ante todo) también comprendió mis miles y millones de dudas y a mi circunstancias emocionales.

A mi familia materna, gracias por darme el espacio que necesité, y apoyarme en mis grandes momentos de flaqueza.

A mi hermano gracias por la ayuda en la parte gráfica, gracias por prestarme tu joyita, ofrecerme tu ayuda y por ser muchas veces mi Mecenaz. Paciencia que todo se devuelve en la vida.

Gracias también a todas mis amigas y amigos que me ofrecieron total apoyo, material y emocional, por supuesto que son importantes.

A Valentina Contreras, quien me entregó poderosas herramientas para enfrentar este tipo de situaciones.

A Rodrigo Domingo, quien siempre quiso participar e impulsó el aceleramiento y combatió el abandono de deberes.

Paola Raffo, gracias por prestarme el computador y darme acceso gratuito a Internet, prestándome tu casa.

Gracias Helen Munizaga y Leo Jeffs, por prestar interés en leer mi tesis.

RESUMEN

Se estudió la presencia de *Trypanosoma cruzi* en roedores silvestres y cosmopolitas (reservorios del ciclo silvestre), en sectores de las comunas de Calera de Tango y Til-Til, ubicados a 16 y 59 Km. respectivamente de la ciudad de Santiago. Se capturó un total de 138 roedores incluyendo ejemplares de *Octodon degus*, *Rattus rattus*, *Phyllotis darwini*, *Abrothrix olivaceus* y *Abrocoma bennetti*. Se les extrajo 0,5 ml de sangre mediante punción cardiaca, con el objetivo de determinar la frecuencia de *T. cruzi* por medio de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Las muestras fueron sometidas a extracción del ADN contenidas en ellas, amplificación y detección de la región hipervariable de los minicírculos del ADNk de *T. cruzi*. Con el fin de visualizar el producto de la amplificación, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y se observó en transiluminador de luz ultravioleta.

Se detectó la presencia de *T. cruzi* en 19 (14,84%) de las 128 muestras, diez de *R. rattus*, (7,25%), siete de *O. degus*, (5,07%), y dos de *P. darwini*, (1,45%). Los ejemplares de *A. olivaceus* y *A. bennetti* resultaron negativos. Estos resultados demostraron la circulación del parásito en la comunidad de micromamíferos, de lo que se puede concluir que los triatomíneos usan la sangre de roedores (silvestres y sinantrópicos), como alimento lo que asegura el mantenimiento del ciclo silvestre y peridoméstico del parásito, en las zonas rurales estudiadas en el presente trabajo.

ABSTRACT

The presence of *Trypanosoma cruzi* in sylvatic and cosmopolitan rodents (sylvatic reservoirs). Was studied in two sites: Calera de Tango and TilTil, situated to 16 and 59 km from Santiago de Chile respectively. One hundred thirty eight rodents were captured. Five species were included: *Octodon degus*, *Rattus rattus*, *Phyllotis darwini*, *Abrothrix olivaceus* and *Abrocoma bennetti*. A sample of 0.5 ml of blood was obtained by heartpuncture to determine the frequency of *Trypanosoma cruzi* infection through Polimerase Chain Reaction test (PCR). The blood samples were processed for DNA extraction, amplification and detection of hipervariable region of kDNA's minicircles of the *T. cruzi*. They were also submitted to electrophoresis.

The presence of *T. cruzi* was detected in 19 (14.84%) of the 128 samples, 10 *R. rattus* (7.25%), seven *O. degus* (5.07%) and two *P. darwini* (1.45%). Neither, *A. olivaceus* nor *A. bennetti*, had positive results.

The results showed the presence of the parasite in the sampled population, therefore is indicative that triatomines are feeding on both, sylvatic and sinanthropic rodents allowing the permanence of the wild cycle of Chagas's disease in this two rural zones of Santiago de Chile.

INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* que afecta principalmente al ser humano e infecta a mamíferos silvestres y domiciliarios (Schofield *et al.*, 1999).

En 1985 se calculaba que unos 100 millones de personas, el 25% de los habitantes de América Latina, corrían el riesgo de contraer la enfermedad y la prevalencia global de la infección humana por *T. cruzi* en los países endémicos ascendía a 17,4 millones de casos (Aufderheide *et al.*, 2003).

En Chile se han descrito tres especies de Triatominos: *Triatoma infestans*, que habita en la zona que se extiende desde el paralelo 18°30' al 34°36' Lat. Sur; *Mepraia spinolai*, que se encuentra desde la Región de Atacama, hasta la Región Metropolitana (26° a 33° Lat. Sur) y recientemente se ha descrito una tercera especie de triatomino para Chile, *M. gajardoi*, que habita entre los paralelos 18° y 26° S cuya importancia epidemiológica para la enfermedad de Chagas es desconocida. De estas especies, la primera es la más estudiada e importante dada su participación en el ciclo doméstico de dicha enfermedad tanto en Chile como en el resto de América (Canals *et al.* 1998).

La fuente de alimentación utilizada por la especie domiciliaria es principalmente la sangre de mamíferos entre los que se destacan humanos, gatos, conejos, perros y roedores. Pudiendo ser también la sangre de aves y anfibios parte de su dieta. Las preferencias alimentarias para *M. spinolai* son principalmente el lauchón orejado, el humano, el conejo, el ratón, el degu, la yaca y la cabra, convirtiendo a la vinchuca silvestre en un parásito más generalista que la especie domiciliaria. Durante el verano aumenta el rango de hospederos para ambas especies (Schenone *et al.*, 1985; Rengifo 2000)

En los países participantes de la Iniciativa del Cono Sur para el Control Vectorial de la Enfermedad de Chagas, la reducción media de la incidencia de esta parasitosis ha sido del 94%, por lo que esta tasa en toda América Latina se ha reducido en más del 65% (OMS, 2002).

En Chile, estudios realizados entre 1985 y 1995, mostraron que la prevalencia y distribución de la enfermedad de Chagas se redujo a consecuencia del éxito de las actividades de la lucha antivectorial (OMS, 2002).

En el periodo 1991 y 2001 se redujo el triatomismo domiciliaria a sólo el 5% y la progresiva disminución en las regiones con mayor prevalencia dentro del país, ha llegado prácticamente a su eliminación (OMS, 2002).

La infección de los mamíferos por *T. cruzi* se ha descrito en alrededor de 150 especies en América y se encuentra extendida en numerosos órdenes, siendo los más importantes reservorios el perro y el gato entre los domésticos y *Chinchilla lanigera*, *Octodon degus*, *Abrocoma bennetti* y *Phyllotis darwini* entre los silvestres, la mayoría de ellos presentes en zonas urbanas (Canals *et al.*, 1998). Esto tiene gran importancia, ya que constituyen una fuente de alimento para los insectos, lo que asegura, la mantención de la densidad de los vectores domiciliarios y peridomiciliarios. Alguno de estos mamíferos pueden ser predadores de las vinchucas y otros pueden desempeñar un importante papel en la dispersión pasiva de los insectos vectores (OMS, 2002).

En los últimos años se ha detectado, la reaparición de vectores domésticos asociados a diferentes tipos de viviendas (Segura, comunicación personal)¹. La reaparición de ellos puede deberse, a diversas causas, entre otras, a movimientos de poblaciones de insectos, donde los focos más probables serían viviendas vecinas o ambientes silvestres, o por otra parte individuos que sobrevivieron el tratamiento inicial antivectorial, ya sea por fenómenos de resistencia u otros factores (OMS, 2002).

¹ Segura, JA. 2005 [comunicación personal], Jefe del programa Control de Vectores Secretaría regional ministerial de Salud Metropolitana.

En base a denuncias reiteradas, recibidas por la Secretaría Ministerial de Salud Metropolitana de la presencia de especímenes de *T. infestans* en viviendas de sectores rurales de la Región Metropolitana, este organismo efectuó un estudio para definir el origen del vector (Bacigalupo *et al.*, 2006). Este estudio confirmó la presencia de *T. infestans* en sectores silvestres cercanos a viviendas. La presencia de triatomíneos en los alrededores no inmediatos de las casas, supone que su fuente de alimentación son animales silvestres y/o sinantrópicos, éstos últimos mantienen un estrecho contacto con la morada humana, por lo tanto con los humanos y los animales domésticos. Por ello, se estableció determinar la frecuencia de *T. cruzi*, en sangre de estos animales, ya que estarían perpetuando la presencia del parásito en su ciclo silvestre. Este fue el propósito de la presente memoria de título.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una de las zoonosis más importantes dentro de América Latina. Se transmite fundamentalmente de forma vectorial, por medio de insectos triatominos del orden Hemiptera que pertenecen a la subfamilia Triatominae. También está la forma de transmisión no vectorial, incluye la infección transfusional, congénita, por trasplante de órganos y accidentes de laboratorio (OMS, 2002).

La enfermedad de Chagas, es causada por un parásito protozoo flagelado, perteneciente a la clase Kinetoplastida, orden Tripanosomatida, *T. cruzi*, el cual se transmite principalmente de forma vectorial, por contacto de las deyecciones del insecto infectado con mucosas o tejidos del hospedero, donde los protozoos invaden al hospedero mamífero en diversos tejidos, por medio del ingreso a la circulación sanguínea (Van Overvelt *et al.*, 1999).

Ciclo

Los triatominos se infectan con *T. cruzi*, cuando se alimentan de sangre de mamíferos parasitados con el estadio evolutivo del protozoo de tripomastigote. Éstos en el intestino medio del vector se multiplican por fisión binaria, previa transformación al segundo estadio evolutivo de epimastigote,

para más tarde desarrollarse en el tracto digestivo posterior del insecto a la forma de tripomastigote metacíclico, que son los elementos infectantes para los mamíferos (Burleigh y Andrews, 1995).

Estos insectos cuando se alimentan, emiten deyecciones que contienen tripomastigotes, los que atraviesan ya sea las mucosas, la piel por el sitio de la picadura o por otras soluciones de continuidad. Los parásitos ingresan al interior de las células, exceptuando los eosinófilos y neutrófilos, adquiriendo la forma de amastigote. Dentro de las células se reproducen por fisión binaria, produciendo posteriormente la ruptura de ellas, transformándose y liberándose como tripomastigotes a la circulación sanguínea, donde pueden invadir nuevos tejidos y así continuar con su ciclo biológico (Burleigh y Andrews, 1995; Rodríguez *et al.*, 2004).

Ciclos de transmisión de *T. cruzi*

La principal vía de transmisión de *T. cruzi* entre sus hospederos es la transmisión vectorial, en la que son distinguibles tres ciclos: el ciclo silvestre, el ciclo doméstico y el ciclo peridoméstico (Maekelt, 1983).

El **ciclo silvestre** de este protozoo ocurre desde hace millones de años, entre vectores y reservorios silvestres a lo largo de la mayor parte de América. Los

ecotopos primitivos de *T. cruzi* son muy diversos, encontrándose en el norte del continente, en los desiertos norteamericanos, altiplanos andinos, florestas amazónicas y atlántica. La tripanosomiasis silvestre ocurre, en ambientes cerrados o semiabiertos, dependiendo de una serie de factores como el clima, la altitud, la humedad, las características de flora y fauna y la disponibilidad de alimentos. La enfermedad es más prevalente en aquellos ecosistemas donde los vectores pueden formar sus colonias tales como palmares y matorrales, también en sitios específicos como plantas, troncos, pedregales, etc. En este contexto el parásito se encuentra en todo el continente americano, albergándose en mamíferos de medio y pequeño tamaño y en los insectos vectores. Se trata de un estado de equilibrio desarrollado a través de una larga adaptación, que se traduce en la baja o ninguna acción patológica del protozoo sobre sus hospederos naturales (Rodríguez *et al.*, 2004).

Ciclo doméstico: la susceptibilidad del humano y de los animales domésticos a *T. cruzi*, así como la proliferación de los triatomíneos en las viviendas, propiciaron la diseminación parasitaria, pasando el ciclo doméstico a tener fundamental importancia en la expresión de la infección chagásica, independiente de la existencia del ciclo silvestre. En el ciclo doméstico el hombre sobresale como principal reservorio de la infección, llevando al parásito hacia las zonas urbanas y hacia nuevas regiones y países no endémicos. Las profundas acciones sobre el medio natural, por ejemplo la tala y quema de grandes extensiones, promueven la apertura de estos espacios. También las viviendas de mala calidad, otorgan cobijo a los vectores. Por otro lado la

migración de personas portadoras de la infección, hacia las ciudades es un factor a tomar en cuenta en cuanto al mantenimiento de la infección en su ciclo doméstico, dada la alta capacidad de domiciliación de especies de triatomíneos, especialmente *T. infestans* (Fernandes *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 2004).

Ciclo peridoméstico: en este ciclo intervienen algunos mamíferos como los roedores domésticos, marsupiales, gatos y perros que libremente entran y salen de las residencias. Por otra parte se agregan los triatomíneos silvestres que son atraídos por otros factores, como es el caso de *Rhodnius prolixus*, que es atraído por la luz de las casas. Este ciclo sirve de enlace entre los ciclos silvestre y doméstico, existiendo algunos autores que lo incluyen en el ciclo doméstico (Rodríguez *et al.*, 2004).

Clasificación de los triatomíneos

De acuerdo al perfil alimentario de los triatomíneos, y adaptación domiciliaria, éstos se clasifican en cinco grupos. Tipo I: las especies con una fuerte adaptación a la vivienda humana, aunque con focos residuales selváticos y con diseminación pasiva por el hombre; tipo II: los insectos que se encuentran en proceso de adaptación; tipo III: las vinchucas que son silvestres colonizadoras inusuales de la morada humana; tipo IV: los que siendo totalmente silvestres, invaden ocasionalmente las casa, atraídos, principalmente por la luz, pero no son capaces de colonizarlas y finalmente tipo V: las especies que viven

exclusivamente de forma silvestre y que no se adaptarían al ambiente sinantrópico, dadas sus exigencias ecológicas (Zeledón, 1983).

Estudios más recientes (Canals *et al.*, 2000) agruparon a los triatominos en tres. El primer grupo está compuesto por insectos de hábitat doméstico y peridoméstico, (*T. infestans* de Brasil, Argentina y Chile, *T. dimidata* de Ecuador, Costa Rica y México, *T. barberi* de México, *Rhodnius prolixus* de Honduras y Venezuela y *T. maculata* de Venezuela); en el segundo grupo se encuentran las vinchucas principalmente silvestres, colonizadores inusuales de la vivienda humana (*T. proctata*, *T. sanguisuga* y *T. rubida* de Norteamérica y *T. platenses*, y *R. neglectus*). En un tercer grupo estarían agrupados los insectos especialistas (*R. picti*, *Cavernicola pilosa* y *Panstrongilus coreodes*). Esta clasificación deja a *M. spinolai* en una posición intermedia, junto con *T. rubrovaria*, *T. sordida* y *P. megistrus*, (tipo II y III de Zeledón, 1983). Estas especies colonizan el domicilio y peridomicilio, aunque también se encuentran en el hábitat silvestre en nidos de roedores, bajo de las piedras y en nidos de aves. Por lo anterior *M. spinolai* es una especie potencialmente peligrosa, en zonas donde existe contacto con humanos (Canals *et al.*, 2000).

Los triatominos de Chile

En los países de América del Sur, es decir, Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay y Uruguay, el principal vector de la enfermedad de Chagas es *T. infestans*, por sus hábitos exclusivos domiciliarios y peridomiciliarios, es decir, coloniza el interior y peridomicilio de viviendas humanas (Moncayo, 1999). En

Chile se distribuye entre las primeras siete regiones del país, entre los paralelos 18° y 34° latitud Sur (Canals *et al.*, 1998).

M. spinolai es un triatomino endémico, que se halla en diversos sectores ubicados entre los 18° y 34° de latitud sur, esto es, desde la Región de Atacama, hasta la Región Metropolitana (Canals *et al.*, 1998). Presenta un acentuado polimorfismo, con hembras sin alas (ápteras) y machos ápteros o alados. Esta vinchuca prefiere microhábitats cercanos a rocas, o en grietas de las mismas, en guaneras de aves y en cuevas de diversas especies de animales. *M. spinolai* no se destaca por vivir en las cercanías de la vivienda humana, pero esto puede ocurrir si el ser humano invade y construye sus moradas dentro del hábitat de éste triatomino (Cattan *et al.*, 2002).

M. gajardoii, es un triatomino con desconocida importancia epidemiológica para la enfermedad de Chagas, endémico de Chile y se ubica entre los 18° y 26° S. Se distribuye en la zona costera del desierto de Atacama, alimentándose de aves marinas y lagartos (Frías *et al.*, 1998). Se diferencia de *M. spinolai*, en características morfológicas y genéticas, en particular en diferencias de tamaño cromosómico. En estudios recientes se han encontrado otras diferencias cromosómicas en poblaciones de la Isla Pan de Azúcar, que podrían definir una nueva especie o subespecie (Frías, 2004).

Hospederos

La dieta de *T. infestans* incluye sangre de diversos animales endotérmicos, tales como los gatos, los perros, las liebres y los roedores, pero la preferida es la de humanos. Excepcionalmente las aves y los anfibios han sido encontrados formando parte de su alimentación. *M. spinolai*, en cambio, presenta un espectro más amplio de hospederos en sus hábitos dietarios incluyendo: conejo, perro, cabra, gato, roedores silvestres, humano, aves y reptiles. (Canals *et al.*, 2000). Es de notar que la variedad de hospederos incluidos en la dieta de los triatominos depende además de la habilidad de los mismos para alcanzar a su fuente de alimento, la estación del año y los hábitos; sean éstos periurbanos, como es el caso de *T. infestans*, o silvestres, como es el caso de *M. spinolai*, sobreponiéndose ambos nichos, en épocas de verano (Canals *et al.* 2000).

En la mantención del ciclo selvático de *T. cruzi* son importantes contribuyentes los roedores, entre los cuales se han registrado infectados a más de 50 especies. En Venezuela, por ejemplo se han hallado altos índices de infección en puercoespín arborícola, y también en la rata arrocera (40 y 100%, respectivamente) (OMS, 2002).

Reservorios y prevalencias de *T. cruzi*

Un importante número de mamíferos domésticos y sinantrópicos, han sido encontrados naturalmente infectados con *T. cruzi* en prácticamente todos los

países del continente americano, exceptuando Canadá. Algunos de ellos son cabras, ovejas, alpacas, cerdos, conejos, cuyes, ratas y ratones (OMS, 2002). El humano, el perro y la zarigüeya u opossum, son los reservorios más importantes para *T. cruzi*, en sus respectivos ciclos, (doméstico y silvestre). El humano es considerado el reservorio de mayor importancia, ya que tiene una expectativa de vida mayor a 60 años (OMS, 2002)

La proporción de reservorios infectados es variable, acorde con la situación epidemiológica local, y depende también de la magnitud de los rangos de densidad de los triatomíneos infectados en el peridomicilio, o dentro de una unidad geográfica. En general la circulación de *T. cruzi* en el ciclo es dinámica, y los reservorios contraen la infección a tempranas edades, a través del contacto con los triatomíneos (OMS, 2002). Los numerosos mamíferos silvestres que se han encontrado parasitados por *T. cruzi*, en general corresponde a los siguientes órdenes: Marsupiales, Edentados, Roedores, Quirópteros, Carnívoros, Lagomorfos y Primates. Dentro de ellos los de mayor relevancia como reservorios silvestres pertenecen a los tres primeros (OMS, 2002; Schweigmann *et al.*, 1995; Apt y Reyes, 1990).

La zarigüeya, ampliamente distribuida en el hemisferio oeste, es uno de los hospederos de *T. infestans* más frecuentes en todos los países donde se ha estudiado (Schweigmann *et al.*, 1995). El opossum se encuentra en árboles y arbustos, habitando lugares cercanos a las viviendas humanas, probablemente

es el reservorio silvestre más importante, porque es éste omnívoro y muy prolífico, con un alto poder de adaptación y muy altos índices de infección a *T. cruzi*, desde 20% hasta un 100%, sin presentar evidencia de enfermedad (Urdaneta-Morales y Nironi, 1996; Ravinovich *et al.*, 2001).

En Argentina el reservorio silvestre más importante de *T. cruzi* es *Didelphis albiventris* con una prevalencia anual que varía entre 29 y 50% (Schweigmann *et al.*, 1999). Esta prevalencia en este hospedero coexiste con una muy baja infección del triatomino (particularmente con *T. guasayana*), a veces menor al 1% (Wisnivesky-Colli *et al.*, 1992).

En Perú y Bolivia, donde los cuyes (*Cavia porcellus*) son criados en el hábitat peridomiciliar, para servir de alimento al hombre los índices de infección, en estudios publicados para el año 1979, llegaron a 19,2% y 61,1% respectivamente. En animales como ratones y ratas, se encontraron índices de infección de 3% a 30% (Maekelt, 1983).

En el Perú, los principales reservorios son roedores, *C. porcellus*, *Mus musculus* y *Rattus rattus* (Vargas, 2005) y en menor proporción mamíferos como perros, gatos, cerdos, conejos, vacunos, etc. Dentro de los animales silvestres encontrados naturalmente infectados en este país, están las zarigüeyas y los monos (Vargas, 2005). En un estudio en Perú, se estableció como principal fuente de alimento de *T. infestans*, dentro de una captura de 581 vinchucas, a aves, roedores, humanos y perros (Solís *et al.*, 2003).

En Ecuador, la rata es el hospedador intra-domiciliar primario de *T. dimidiata*. (Calderón-Arguedas *et al.*, 2001)

En el Norte de Brasil, un total de 1.197 animales silvestres en el Estado de Pará, del fueron examinados en busca de parásitos tripanosomas, se encontró en 13 especies distintas, y fueron particularmente comunes en una variedad de marsupiales (Didelphidae), puercoespines (*Coendou* spp.), armadillos (*Dasypus novemcinctus*) y coatí (*Nasua nasua*), concluyendo, de esta forma que la infección con *T. cruzi* en el sureste de Brasil es mantenida por *D. albiventris* en su ciclo silvestre (Ramírez *et al.*, 2002; Lainson *et al.*, 2004).

En Uruguay se han establecido como reservorios silvestres a *D. hybridus* (armadillo o mulita orejuda), *D. novemcinctus* (armadillo o tatú), *D. albiventris* (Salvatella y González, 1986).

En Venezuela, en tanto, para el año 1978 en una región endémica se encontraron infecciones globales para el hombre de 38,7%, perros y gatos 22% mediante xenodiagnóstico. Así también, usando este método, tres autores reportaron mayor prevalencia de infección en gatos y perros (9,1-28,6%) que en el hombre (8,4%-22,6%) (Maekelt, 1983).

En otro estudio realizado en Venezuela, se encontró a *T. cruzi* infectando de forma natural a 31 especies de vertebrados silvestres. La especie más frecuente encontrada es *D. marsupialis*, con una prevalencia de 25%, en áreas urbanas de Caracas. En tanto que *Rattus* spp., se encontró infectado en 0,74% de los animales capturados, habiendo sido reportada dicha infección en áreas tanto

urbanas como rurales, así también la rata algodónera (*Sigmodon hispidus*) por su parte ha presentado infecciones de 1,36% (De Lima *et al.*, 2006).

En la Provincia de Panamá se demostró, mediante análisis histológicos, la infección por *T. cruzi* en 57 de 100 ratas. Lo anterior demuestra la importancia que estos roedores juegan como reservorios domiciliarios de *T. cruzi*, en ese país (Calderon-Arguedas *et al.*, 2001).

En Costa Rica, entre los años 1964 y 1968 en una localidad endémica a tripanosomiasis, se encontró, un 34,4% de ratas positivas y en zarigüeyas (*D. virginiana*) un 6,5%. En cuanto a los reservorios intradomiciliarios, en el mismo país, se ha informado de una positividad en gatos de 2,9%. El 2002, se demostró positividad en perros, 5,2% en perros de compañía de zonas endémicas y un 1,6% en mascotas de zonas no endémicas. Esto demostró un nexo epidemiológico importante de estos animales con la posible transmisión de esta parasitosis (Reyes *et al.*, 2002).

En otro estudio de contenido intestinal de estos insectos, la sangre humana constituyó el sustrato de alimentación más abundante, seguido por la sangre de perro. Sangre de rata, ratón, didélfidos y gallinas se encontraron en porcentajes inferiores al 15%. La sangre de didélfidos fue la menos frecuente (Calderon-Arguedas *et al.*, 2001).

En México se han detectado como reservorios silvestres, las siguientes especies: *D. virginiana* (tlacuache u opossum); *D. novemcinctus mexicanus* (armadillo); *Canis familiares* (perro); *R. norvegicus* (rata noruega); *R. rattus* (rata de albañal) *S. hispidus* (ratón de campo); *Ototylomys phyllotis* (ratón de campo); *Tyloma nudicudus* (ratón de arborícola); *Mus musculus* (ratón) *S. vulgaris* (ardilla); *Bos taurus* (toro); *Carollia perspicillata* (murciélago frutero), *Peromyscus mexicanus* (ratón de campo); *P. aztecus* (ratón de campo). Se ha comunicado un 11% de positividad por xenodiagnóstico en 8 especies de mamíferos silvestres (Domínguez y Espinoza, 1988; Domínguez *et al.*, 1990).

En Estados Unidos se encontró una prevalencia de 33,3% de infección con *T. cruzi* para opossum y 1,1% para armadillos, en otro estudio se menciona para la misma especie 28,8% de infección, en el Sur de Louisiana (Yaeger, 1988; Barr *et al.*, 1991).

Prevalencia de *T. cruzi* en mamíferos de Chile

La prevalencia en animales silvestres, comunicada hasta el año 1946 iba desde un 2,9 a un 13,5%. Entre las especies silvestres estudiadas, el roedor *O. degus* mostraba un 8,9% de infección. Hasta ese momento, se desconocía el impacto de *T. cruzi* en mamíferos silvestres (Schenone *et al.*, 1985; Apt y Reyes, 1986). En las zonas endémicas de Chile las tasas globales de infección por el *T. cruzi* eran 15,1% para el gato y 11,7% para el perro (Apt y Reyes, 1986).

En la localidad de Aucó, IV Región, las primeras comunicaciones sobre el *T. cruzi*, vectorizado por *M. spinolai*, se refieren a *Ch. lanigera*, *A. benetti*, *O. degus* y *P. darwini*. En estudios efectuados en la Provincia de Limarí de la misma región entre 1980 y 1983, se demostró que el 16,9% de los animales domésticos y sinantrópicos (caninos, bovinos, equinos y caprinos) eran portadores del parásito (Durán *et al.*, 1989).

Estudios de prevalencia en mamíferos, realizados entre los años 1982- 1984 (Regiones V, Metropolitana RM, y VI), mediante reacción de hemaglutinación indirecta (RHAI) mostraban que las mayores prevalencias dentro de los reservorios domésticos se encontraban en la RM, después de la IV Región, (Flores *et al.*, 1984; Traslaviña, 1984) constituyendo perros y gatos los principales portadores de *T. cruzi* con prevalencias de 11,5 y 10,9%, respectivamente. En cambio, la región con menores porcentajes de infección, para los mismos hospederos era región de Valparaíso, con prevalencias de 1,9 y 1% para caninos y felinos respectivamente (Venegas *et al.*, 1984; Villarroel *et al.*, 1984).

Por otro lado, en la Región del Libertador Bernardo O'higgins, la positividad a *T. cruzi* encontrado para cabras fue 18,2% y en conejos 6,4%. En una investigación en cabras, en la Región de Coquimbo, la positividad fue menor que la registrada en la VI Región (4,7% y 5,9 %) dentro del mismo periodo (Ulloa, 1984; Venegas *et al.*, 1984).

En 1985 se informó que la frecuencia de infección por *T. cruzi*, fue de 12,2%, para humanos, bajando la prevalencia para todos los animales antes reportados, como tasa global de país, con 1,3% para los gatos y perros, mientras que en lagomorfos disminuyó de 6,4 a 2,4% y en Caviidae se registró 0,8% de infección (Schenone *et al.*, 1985).

En 1986 se reportó un 33,3% en *C. lanigera* y un aumento en *O. degus* de 2,2% en 1939 a un 5% en 1980. El perro en el mismo período presentó una disminución de 5,3% y 1,3% de infección, similar a lo ocurrido con el zorro gris, *C. griseus* que fue de 7,1% a 3,8%. Se investigaba también, en ese entonces la positividad para *T. elegans*, *A. bennetti* y *Phyllotis* spp (Apt y Reyes, 1986).

En 1989, en la localidad de Aucó IV Región, el índice global de infección con *T. cruzi* en animales silvestres, se mantuvo según los registros de 1946, en 13,5%. *A. bennetti* obtuvo su mayor registro, 36,4% (usando RHAI), y 11,1% según xenodiagnóstico; *C. lanigera* disminuyó ligeramente variando entre 20% y 31,6% según RHAI y 6,1% según xenodiagnóstico; *P. darwini*, al igual que *A. bennetti* alcanzó su cifra más alta registrada, 10% y finalmente *O. degus* aumentó su porcentaje de animales infectados, presentando 8,3% según serología y 12,9% según xenodiagnóstico (Durán *et al.*, 1989).

En 1990, dentro de la Reserva Nacional Las Chinchillas, en la IV Región, se obtuvieron prevalencias mayores de infección, 40% en *C. lanigera*, y 21% en *O. degus*. Las muestras fueron analizadas mediante RHAI. En cambio *P. darwini*

disminuyó en dos puntos porcentuales (8%) respecto de los datos obtenidos en 1989 en la misma región. En este estudio se entregaron datos de infección de *Abrothix longipilis* la que alcanzó a un 8% (Jiménez y Lorca, 1990).

En otro estudio del año 1990, se definieron los mamíferos reservorios para *T. cruzi* más importantes para Chile. Entre los pertenecientes al ciclo silvestre estaban *C. lanigera* (29,4%), *O. degus* (5,3%), *A. bennetti* (7,4%), *Canis griseus* (3,8%), y *P. darwini* (2,5%). Entre los domésticos, gato 6,1% y perro 3,2% (Apt y Reyes, 1990).

Datos más recientes, obtenidos mediante técnicas diagnósticas más sensibles, como la PCR, mostraron un 43,3% de positividad en 68 individuos de diversas especies, porcentaje que subió a 51% al complementar con el análisis de Southern Blot. Este estudio es el que ha registrado las mayores cifras de prevalencia en animales silvestres y sinantrópicos (Rozas *et al.*, 2005). El detalle por especies y prueba respectivamente fue el siguiente: para *Capra hircus* 35,7% y 26,2%, *A. olivaceus*, 45,5% y 59,1%, *Octodon degus* 42% y 51%, *T. elegans* 46% y 46%, *P. darwini* 41% y 45%, (Rozas *et al.*, 2005).

Perfil Alimentario de los triatominos chilenos

Triatoma infestans ha sido bastante estudiada con respecto a sus fuentes de alimentación, las que son preferentemente animales endotérmicos (90,2%), con una preferencia significativa por sangre humana (68,4%), y en menores proporciones, gatos, conejos, perros y roedores, (6,1%, 5,9%, 3,2% y 1,6% respectivamente), (Maeckelt, 1983; Schenone *et al.*, 1985). La presencia de sangre de aves y anfibios en el contenido intestinal de algunos insectos, confirma que *T. infestans*, también se alimentaría con sangre de otros vertebrados (Schenone *et al.*, 1985). *Mepraia spinolai* es un depredador más generalista que *T. infestans*, *M. spinolai* es un insecto muy agresivo, que se alimenta de cualquier hospedero, preferentemente durante el día (Sagua, *et al.*, 2000; Frías *et al.*, 1998; Canals *et al.* 1998).

En un análisis temporal de los estudios realizados, se encuentra inicialmente el trabajo de Knierim *et al.* (1976) quienes revisaron la alimentación de 87 ejemplares de *T. infestans* obteniendo un 77% con sangre de sólo un hospedero, mientras que el resto se alimentó de más de uno. La dieta de estos individuos fue ratón en su mayoría 82,14%, seguido de cobayo 42,86%, rata 39,28% y cabra 35,7%.

Los diversos estudios efectuados entre los años 1985 y 2001 dirigidos a establecer las preferencias alimentarias de *M. spinolai* muestran como primera preferencia al conejo, con porcentajes de inclusión que van desde un 50%, a un 76,8% (Cruzat, 1997; Canals *et al.*, 1998; Rengifo, 2000 y Canals *et al.* 2001). Son excepciones el caso de 10 ejemplares capturados en viviendas de un

observatorio astronómico, donde la fuente de alimentación de todos, fue sangre humana (Schenone *et al.*, 1985) y en un análisis de ejemplares de la Isla Pan de Azúcar, IV Región, que demostró que *M. spinolai* se alimentaba principalmente de aves marinas (78%), mamíferos marinos (14%), y lagartijas *Tachymenis peruvianus* (7%). Este ha sido el primer registro de alimentación de triatominos de mamíferos marinos (Sagua *et al.*, 2000).

No hay un patrón definido de preferencias, con excepción del conejo. Esta varía dependiendo del lugar de muestreo donde se realizó el estudio. Estos porcentajes se distribuyen en diversos mamíferos y van desde 37,1%, para roedores, hasta 12,3%, como cifra más baja correspondiendo a perro. Las aves, en particular, han presentado, por lo general, el más bajo porcentaje de participación en la dieta de las vinchucas (Cruzat, 1997; Canals *et al.*, 1998; Rengifo, 2000 y Canals *et al.*, 2001)

Preferencias alimentarias de los triatominos e infección en animales.

Se ha comprobado en toda América que los mamíferos están involucrados en la mantención de la enfermedad de Chagas en los ciclos doméstico y silvestre de *T. cruzi* (OMS, 2002).

Las preferencias alimentarias de las vinchucas están directamente relacionadas, al menos para el ciclo doméstico, con los mayores índices de infección del parásito *T. cruzi*. Lo anterior ubica dentro de los tres primeros lugares de preferencia al perro, al gato y al humano. Esta relación se confirma por

estudios hechos en áreas endémicas de Argentina, donde se demuestra que los perros son los principales donantes de parásitos, para los triatominos, planteándose así un importante papel como centinelas naturales en la vigilancia epidemiológica, detectando la introducción de la enfermedad de Chagas al ciclo doméstico (Gürtler *et al.*, 1993; Castañera *et al.*, 1998).

Ya en el año 1985 se demostraba en Chile, que el orden de mamíferos infectados coincidía relativamente con el orden de las fuentes de alimentación de los triatominos, éstas eran Hominidae 68,4% de preferencia y 12,2% de infección, para Felidae 6,1 y 1,3%, para Lagomorfos 5,9% y 2,4% y Canidae 3,2% y 1,3% (Schenone *et al.*, 1985).

El conejo, es un importante reservorio en el ciclo silvestre de *T. cruzi*, en la zona central de Chile, siendo una de las fuentes preferentes de alimentación de las vinchucas (Rengifo 2000; Canals *et al.*, 2001).

En diversos estudios de preferencia alimentaria de las vinchucas, han sido incorporados los roedores en un rango que va desde 9,9% hasta un 82,1%; en triatominos silvestres y 1,6% hasta 6,1% en vinchucas domésticas (Knierim *et al.*, 1976; Canals *et al.*, 1998).

En investigaciones de prevalencia de *T. cruzi* en animales, se ha logrado establecer a los roedores en porcentajes que van desde un 1,6% hasta 51,7%

de infección. Estas cifras fueron obtenidas en zonas rurales y silvestres respectivamente (Apt y Reyes, 1990; Rozas *et al.*, 2005). Es posible atribuir estos resultados a la mayor sensibilidad de las pruebas empleadas para detectar al parásito.

Los datos indican una alta preferencia alimentaria hacia los roedores en sectores silvestres. La inclusión de estos animales en la dieta de las vinchucas se puede ver reflejada en la prevalencia de infección de los mismos, al menos para los pertenecientes al ciclo silvestre (Knierim *et al.*, 1976; Apt y Reyes, 1990; Canals *et al.*, 1998; Rengifo 2000; Rozas *et al.*, 2005).

En cuanto a cambios conductuales, de insectos infectados o no con *T. cruzi*, Canals *et al.* (2001) no encontraron diferencias respecto a sus hábitos alimentarios. Se mantiene así inalterable tanto la frecuencia de alimentación, como la preferencia por los diferentes hospederos. Determinando, que el comportamiento de las vinchucas, en lo que a sus fuentes de alimento se refiere, depende principalmente de la habilidad para picar a su víctima y a la abundancia relativa de los hospederos, y no a cambios conductuales vinculados a la infección de los insectos.

Clínica

La Enfermedad de Chagas se caracteriza por producir, en el ser humano, un periodo asintomático o con escasa sintomatología. Este periodo se manifiesta,

por un signo clínico denominado chagoma de inoculación, que es una inflamación local en el sitio de infección, el que se manifiesta de preferencia en partes del cuerpo habitualmente descubiertas al dormir, es de tamaño variable, que casi siempre altera el color de la piel, es poco o nada doloroso. Este signo aparece donde ocurre la multiplicación primaria del agente patológico, *T. cruzi*, en el momento en el que un insecto, hematófago vector, pica al hospedero y lo infecta. Cuando ocurre en un lugar próximo a los ojos, puede producir una lesión unilateral transitoria, llamada signo de Romana- Maza, dicha lesión está descrita como edema periocular, unilateral, bpalpebral, unida a conjuntivitis y adenopatía satélite (OMS, 2002).

El periodo crónico de la infección, se subdivide en una etapa crónica latente, donde se encuentra más del 70% de la población afectada, caracterizándose por ser asintomática, y una etapa crónica secuelar, donde las manifestaciones más importantes son a nivel digestivo (megasíndromes), y a nivel cardiaco (cardiomiopatías), (OMS, 2002).

Otra importante entidad clínica la conforma la enfermedad de Chagas transplacentaria, la que puede transmitirse verticalmente, en cualquier etapa de la enfermedad materna y en embarazos sucesivos (García *et al.*, 2001).

Los daños producidos por la invasión celular, conlleva a la destrucción de los tejidos y alteración de los órganos involucrados, constituye uno de los principales eventos en la patología de la enfermedad. Sin embargo el propio sistema inmune del individuo parasitado, cumple un rol en la génesis del daño orgánico, ya sea por complejos inmunes o por autoinmunidad (García, 2001).

Caracterización de *T. cruzi*

Las poblaciones de *T. cruzi* se dividen en dos principales lineajes. Estas divisiones están hechas de acuerdo a agrupaciones isoenzimáticas, análisis mediante de polimorfismos en el ADN amplificados al azar (RAPD) y análisis genéticos de varias cepas representativas de la variabilidad del taxón. Los lineajes 1 y 2, son denominados también segundo y primer filum mayor. Otras de las denominaciones acordadas en el Simposio Internacional en conmemoración del 90° aniversario del descubrimiento de la enfermedad de Chagas, Abril del 1999, Río de Janeiro, Brasil, se realizó un “meeting” satelital sobre recomendaciones de estandarización de la nomenclatura de *T. cruzi*; en él destacan denominaciones como *T. cruzi* (Tc I) equivalente al Zimodema 1 o Type III, Lineaje 2, Grupo 1, Ribodema II/III, 1er filum mayor, o similares y *T. cruzi* II (Tc II) a aquellas equivalentes al Zimodema 2, Zimodema A, Type II, Lineaje 1, Grupo 2, Ribodema I, 2do filum mayor o similares (Andrade y Magalhaes, 1997; García, 2001).

Así Tc I es de origen selvático principalmente, y circula entre animales y triatomíneos silvestres. En tanto que el Tc II se asocia con un ciclo domiciliario,

manteniéndose entre insectos y animales domésticos (García, 2001; Ramírez *et al.*, 2002).

Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas en el hombre, se realiza mediante métodos indirectos, como ELISA, Reacción de Inmunofluorescencia (RIFI), Hemoaglutinación Indirecta, Reacción de anticuerpo lítico, Reacción de Fijación del Complemento, Acoplamiento a los Anticuerpos; y mediante métodos directos convencionales, como frotis sanguíneo, gota gruesa, métodos de concentración, (Análisis de Extendido de la “Capa Blanca”, Triple Centrifugación, Centrifugación con Silicona Líquida, Microstrout), lámina laminilla, xenodiagnóstico, hemocultivo, inoculación en animales sensibles y métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (García *et al.*, 2001). Cada una de estas técnicas posee diferentes sensibilidades, especificidades y grados de utilidad según la etapa de la enfermedad en que se encuentre el individuo. Los métodos indirectos, están orientados a la detección de anticuerpos específicos producidos por el sistema inmune ante el estímulo antigénico que representa el parásito. En cambio la finalidad de los métodos directos, es la identificación visual del parásito o alguna fracción del él, como es el caso de la PCR que detecta ADN del *T. cruzi* (Rodríguez *et al.*, 2004). El examen de sangre al fresco se realiza cuando se presenta la fase aguda de la enfermedad, o cuando se sospecha de ella. Con esta técnica es posible visualizar parásitos vivos y móviles que están circulando en la sangre muestreada. La sensibilidad de este examen en fase aguda, dentro del punto

mayor de parasitemia, es menor al 50% para un solo examen, lo que implica que para aumentar la sensibilidad de la técnica, se debe repetir varias veces (Rodríguez *et al.*, 2004).

La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) tiene variados blancos de detección dentro de la estructura del protozoo, que van desde el ADN nuclear hasta el ADN del kinetoplasto (ADNk), (estructura que lo clasifica dentro del orden Kinetoplastidae), el cual se encuentra dentro del mitocondrion, en la base del flagelo, y está constituida por una red de maxicírculos y minicírculos, donde se encuentra el 20% del genoma del *T. cruzi*. Los maxicírculos son moléculas de ADN circular homogéneas, mientras que los minicírculos son heterogéneos y están organizados dentro de cuatro regiones bien conservadas de 120 pares de bases (pb) y separadas por cuatro regiones muy variables. La mayoría de las pruebas de amplificación para el diagnóstico y clasificación de aislados de *T. cruzi*, están basadas en secuencias provenientes del ADNk (Rodríguez *et al.*, 2004).

Existen diversos oligonucleótidos partidores para cada una de estas zonas del ADN, siendo los más utilizados, debido a la alta sensibilidad y especificidad, los partidores 121 y 122. Estos amplifican la región hipervariable de los minicírculos del ADNk, dando una banda de 330 pb en un gel de agarosa (García, 2001).

La PCR representa la técnica más adecuada para estudios epidemiológicos en insectos vectores y animales, ya que ésta utiliza pequeñas cantidades de muestra, manteniendo su alta sensibilidad y especificidad. Además, puede ser aplicada en cualquier especie animal (Rodríguez *et al.*, 2004).

Formulación del problema

Debido a las reiteradas denuncias recibidas por de la presencia *T. infestans* en viviendas de sectores rurales de la Región Metropolitana y habiéndose demostrado su presencia en los alrededores no inmediatos de las casas, se planteó el presente estudio, considerando a los mamíferos silvestres como la principal fuente de alimentación.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la frecuencia de *T. cruzi* en sangre de roedores silvestres y cosmopolitas, en dos zonas rurales de la región Metropolitana, a través de la técnica de PCR.

Objetivos específicos

Establecer las especies de roedores presentes en ambas zonas y sus abundancias relativas.

Establecer la frecuencia de infección por *T. cruzi* en las especies de roedores capturados.

Relacionar las frecuencias de infección por *T. cruzi* en los roedores, con su abundancia relativa.

MATERIAL Y MÉTODO

1.-Zona geográfica en estudio

Los lugares en donde se realizó el trapeo de los roedores fueron seleccionados de acuerdo a las mayores densidades de capturas de los vectores, esto fue en sectores de colinas y cerros pertenecientes a las comunas de Calera de Tango y Til-Til.

Sectorización

Los datos de georeferenciación satelital (GPS) de los individuos capturados, registrados, tanto en este trabajo, correspondientes a roedores, como los datos aportados por Bacigalupo, *et al.*, (2006), correspondientes a triatomíneos, dentro de la misma zona de estudio, fueron procesados mediante el programa arcview, para visualizarlos en un mismo mapa con el fin de ver la existencia de sobreposición de ámbitos de hogar entre los roedores y los focos de vinchucas (Figs. 4, 5 y 6).

2.-Métodos de captura (Trampas, días y temporalidad)

Se utilizaron trampas desmontables tipo Sherman, cebadas con avena pelada arrollada. Las jaulas fueron numeradas correlativamente del 1 al 40 y registradas y posicionadas en el terreno. Las variables consideradas para colocar estas trampas fueron presencia de excremento fresco de roedores, huellas y madrigueras. Como norma general se dispusieron, con preferencia, donde tales señales se asociaban con ejemplares de *Puya* spp (chagual), que brinda cobijo a gran cantidad de animales, al estar provistos de espinas y tener grandes raíces que se usan como madrigueras.

Las trampas fueron puestas los días lunes de cada semana y revisadas por los cuatro días siguientes durante las primeras horas de la mañana. Cada jaula con captura fue reemplazada por una vacía y cuando fue necesario se volvió a rellenar con el cebo. Las jaulas con roedor fueron transportadas a la Unidad de Parasitología de la Facultad de Medicina Occidente de la Universidad de Chile (UPFMO), donde, se tomaron las muestras de sangre, previa identificación del animal, lo que incluyó el número de la trampa donde fue capturado, el género y la especie. Luego se procedió a anestesiarlo, en una bolsa de plástico con un algodón embebido en un anestésico inhalante en su interior, para proceder la obtención de cada muestra.

Extracción de sangre

Se realizó mediante punción cardiaca, la que se llevó a cabo siempre bajo anestesia general, introduciendo una aguja de 21 o 23 G inmediatamente debajo del esternón, hasta incidir en el corazón. Se obtuvo como máximo 0,5 ml de sangre, la que fue depositada en tubos Eppendorff con igual volumen de Guanidina-HCl 6M y EDTA 200 mM, como anticoagulantes.

Este es un método que está recomendado para efectuar sangrías totales, pero también es usado para obtener muestras únicas de sangre en diversos animales como cobayos, hámsters y ocasionalmente en los hurones; sin embargo en ratas, se registra una tasa de mortalidad del 12%, después de la punción cardiaca) (Morton *et al.*, 1993).

Los animales en recuperación fueron mantenidos separados del resto hasta que estuvieron completamente conscientes. Cuando se trató de especies plaga, fueron sacrificadas.

Reacción en Cadena de la Polimerasa para el diagnóstico de *T. cruzi*.

La técnica de PCR fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del UPFMO.

1.-Obtención del ADN

El ADNk fue obtenido según metodología estándar utilizada para el Kit QIAamp DNA mini kit blood (Labtrade Inc. USA).

2.-Amplificación y detección de región hipervariable de los minicírculos del ADNk de *T. cruzi*. Del ADNk obtenido se extrajeron 20 µl con el fin de agregarlos a un tubo de PCR con una solución compuesta por buffer Tris-HCl 200 mM pH 8,4 y KCl 500 mM; dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM; MgCl₂ 1,5 mM; Taq ADN Polimerasa (2,5 U/µl); oligonucleótidos 121 [5'-AAATAATGTACGG(T/G)-GAGATGCATGA-3'] y 122 [5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'], 0,5 µM y agua bidestilada c.s.p. 100 µl en su interior.

3.- Termociclador Minicicler (Lab. M.J. Research, USA) Posteriormente el tubo de PCR fue puesto en el termociclador, programado con 2 ciclos de 98°C/1 min - 64°C/2 min, 33 ciclos de 94°C/1 min - 64°C/1 min y un ciclo final de 74°C/10min.

4.-Electroforesis y visualización

Con el fin de visualizar el producto de la amplificación, se utilizó 15 μ l de las muestras, mezclándolas con 5 μ l de buffer de corrida, conformado por glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25%, xileno-cianol 0,25% y H₂O bidestilada c.s.p. 100 ml. ; posteriormente fueron sometidas a electroforesis en cámara horizontal por 1 hora en buffer Tris/borato/EDTA pH 8,3 (TBE) con un voltaje constante de 120 Volts, utilizando como soporte, agarosa al 2% con 15 μ l de Bromuro de Etidio 10mg/ml, en buffer TBE. Además se utilizó un marcador de peso molecular (Φ x174 DNA Hae III, Life Technologies, Inc. USA). Al terminar el proceso de electroforesis y se observó con un transiluminador de luz ultravioleta.

Las muestras positivas fueron aquellas que presentaron una banda de 330 pb, correspondiente a la región hipervariable del minicírculo del ADNk del *T. cruzi*.

Finalmente, como complemento a esta memoria se caracterizaron las distintas formas de *T. cruzi* en clones por medio de la prueba Southern blot.

RESULTADOS

Entre Enero y Marzo de 2005, se llevó a cabo este trabajo logrando una captura de 138 roedores, sin embargo, sólo se utilizaron muestras de 128 ejemplares, ya que algunas presentaron problemas de coagulación, que no permitieron llevar a cabo la técnica de la PCR.

De los 138 animales, 122 fueron capturados en Calera de Tango, cuyo detalle fue 65 de *O. degus* (53,28%), 49 *R. rattus* (40,16%), 4 *P. darwini* (3,28%), 2 *A. olivaceus* (1,64%) y 2 *A. bennetti* (1,64%),(Fig 1), mientras tanto que en Til-Til se capturó solamente *O. degus* y *P. darwini* con un total de 14 (87,5%) y 2 (12,5%) individuos, respectivamente (Fig. 2) (Cuadro 1).

Del total de 128 muestras de sangre procesadas, 19 (14,84%) fueron positivas a la presencia de *T. cruzi* (ver Cuadro 2) y de éstas, 18 fueron de animales de Calera de Tango y sólo una de animales de Til Til (de un total de 122 y 16 individuos respectivamente). Por especies, la muestra positiva se desglosó de la siguiente forma: (ver Fig. 3) 10 *R. rattus*, 7 *O. degus*, 2 *P. darwini*. En tanto que *A. bennetti* y *A. olivaceus* no presentaron individuos positivos.

El análisis posterior de las muestras positivas amplificadas por PCR a *T. cruzi* e hibridizadas con las sondas específicas, arrojó que de 5 *O. degus*, 3 correspondían al clon TcII y 2 al clon TcI, mientras que en otros 2 ejemplares de esta especie, al igual que los de *Phyllotis darwini*, no hidridizaron con ninguna de las sondas utilizadas (indeterminado). Todos los ejemplares de *R. rattus* (10) presentaron positividad para el clon TcI.

Finalmente la caracterización de todas las muestras positivas mediante sondas de ADN de *T. cruzi*, fue de 63,16% para el clon TcI, 15,79% para el clon TcII y 21,05% indeterminado (Cuadro 3).

CUADRO 1.- Especies y número de roedores capturados en las Comunas de Calera de Tango y Til-Til, durante Enero y Marzo de 2005.

Especie	Calera de Tango		Til-Til		Total general	
	Nº	% por localidad	Nº	% por localidad	Total	% del total
<i>Abrocoma bennetti</i>	2	1,64	0	-	2	1,45%
<i>Abrotrix olivaceus</i>	2	1,64	0	-	2	1,45%
<i>Octodon degus</i>	65	53,28	14	87,5	79	57,25%
<i>Phyllotis darwini</i>	4	3,28	2	12,5	6	4,35%
<i>Rattus rattus</i>	49	40,16	0	-	49	35,51%
Total	122	100	16	100	138	100%

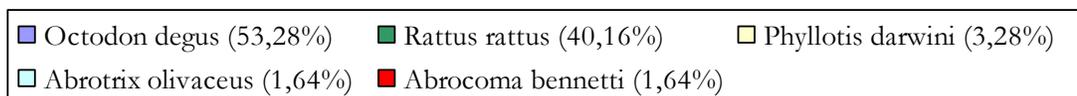
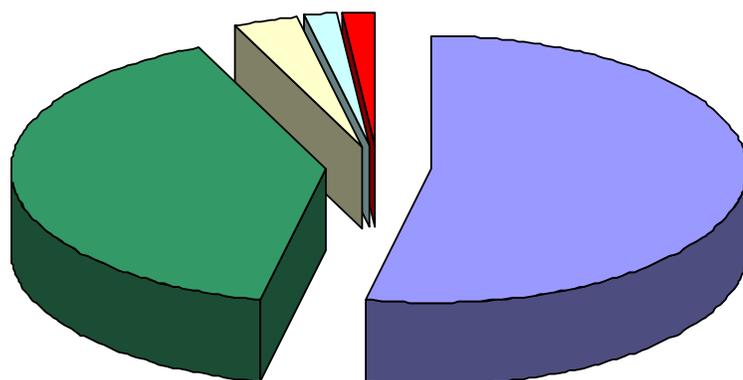


Figura 1.- Abundancia relativa de roedores capturados en la comuna de Calera de Tango.

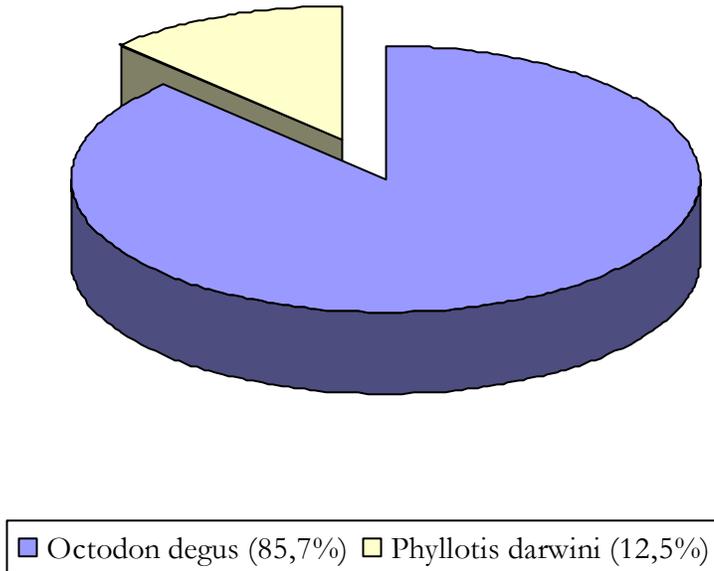


Figura 2.- Abundancia relativa de roedores capturados en la comuna de Til-Til.

CUADRO 2.- Número de muestras positivas a *Trypanosoma cruzi*, mediante la reacción de PCR*, según especie de roedor muestreado y comuna de procedencia.

Especie	Calera de Tango			Til- Til		
	Total muestras	(+)	% (+)	Total muestras	n (+)	% (+)
<i>Octodon degus</i>	60	7	11,67(7/60)	14	0	0 (0/14)
<i>Phyllotis darwini</i>	4	1	25 (1/4)	2	1	50 (1/2)
<i>Rattus rattus</i>	44	10	27,73(10/44)	-	-	-
<i>TOTAL</i>	108	18	16,67(18/108)	16	1	6,25 (1/16)

*: Región hipervariable del ADNk de micicirulos de *Trypanosoma cruzi*

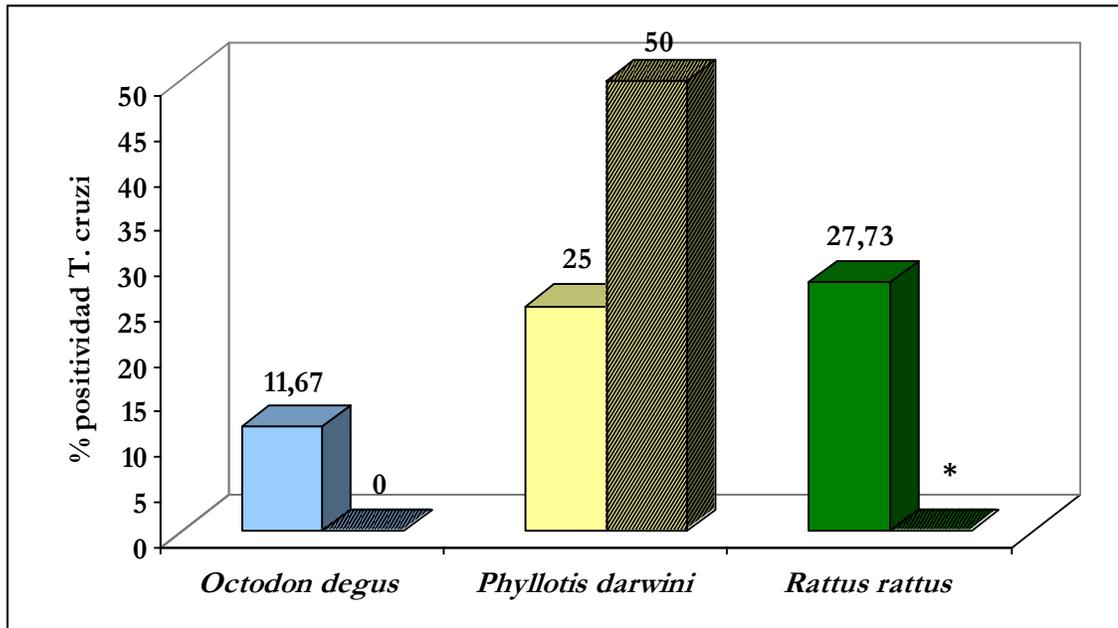


Fig. 3.- Porcentaje de positividad a *Trypanosoma cruzi* mediante PCR* por especie de roedor muestreado en las comunas de Calera de Tango y Til-Til. Barras achuradas corresponden a Til-Til.

*: Región hipervariable del ADNk de micicrulos de *Trypanosoma cruzi*

CUADRO 3.- Especies de roedores positivas a la Técnica de PCR* y clones de *Trypanosoma cruzi*, mediante Southern Blot.

Clones de *Trypanosoma cruzi*

Especies	TcI (%)	TcII (%)	Indeterminado (%)
<i>Rattus rattus</i>	10/10 (100)	0/10 (0)	0/10 (0)
<i>Phyllotis darwini</i>	0/2 (0)	0/2 (0)	2/2 (100)
<i>Octodon degus</i>	2/7 (28,57)	3/7 (42,86)	2/7 (28,57)
Total	12/19 (63,16)	3/19 (15,79)	4/19 (21,05)

*: Región hipervariable del ADNk de micicrulos de *Trypanosoma cruzi*

Indeterminado: Muestras que no hibridaron con ninguna de las 2 sondas

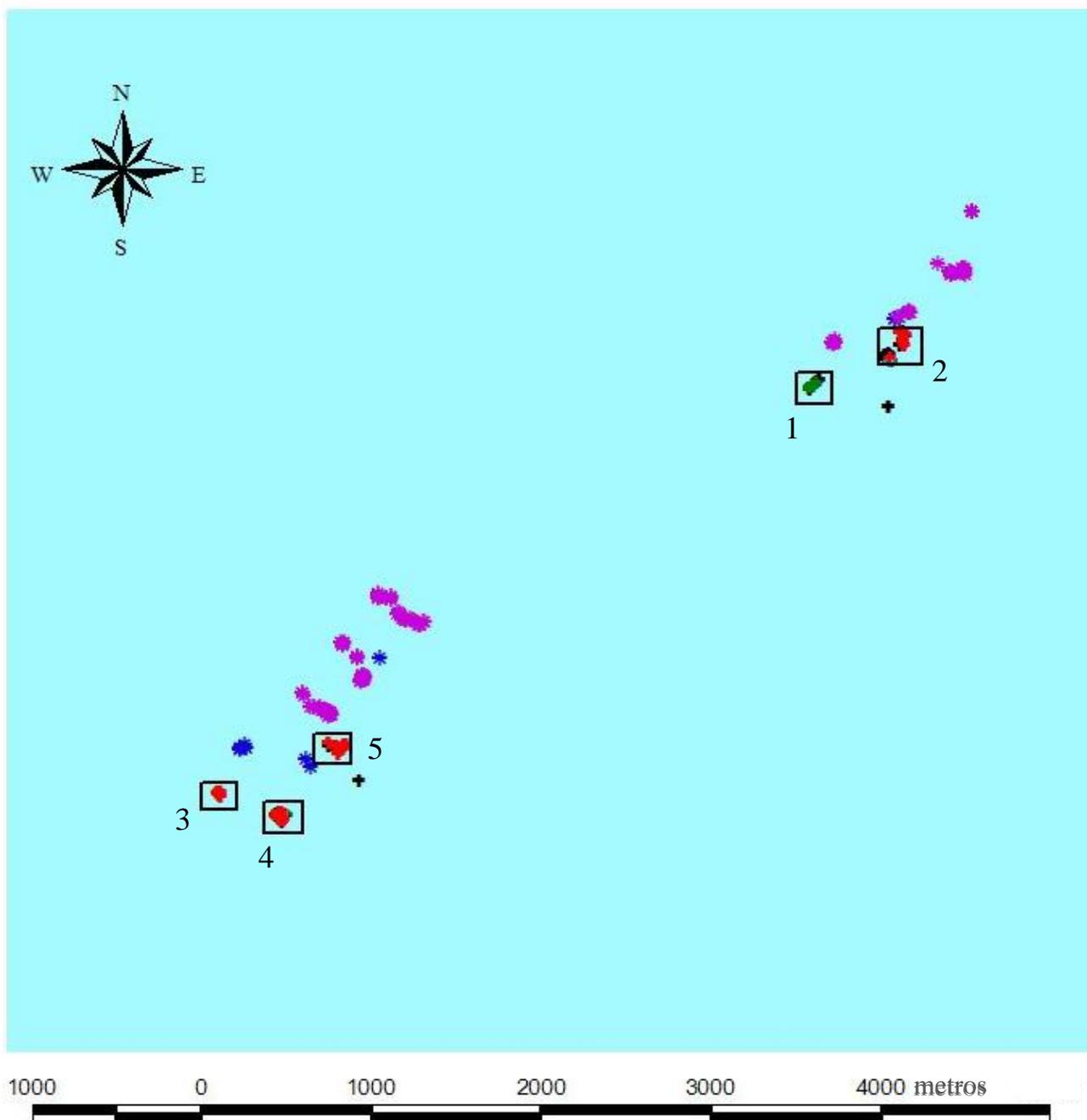


Figura 4 Distribución espacial de triatominos y roedores, capturados dentro de la comuna de Calera de Tango (sectores 1, 2, 3, 4 y 5).

+*Abrocoma bennetti* (-), +*Abrothrix olivaceus* (-), + *Octodon degus* (-), +
Phyllotis darwini (-), + *Rattus rattus* (-), •*Octodon degus* (+), • *Phyllotis darwini* (+), • *Rattus rattus* (+)
 **Triatoma infestans* (-), * *Triatoma infestans* (+)

Calera de Tango Sector demarcado

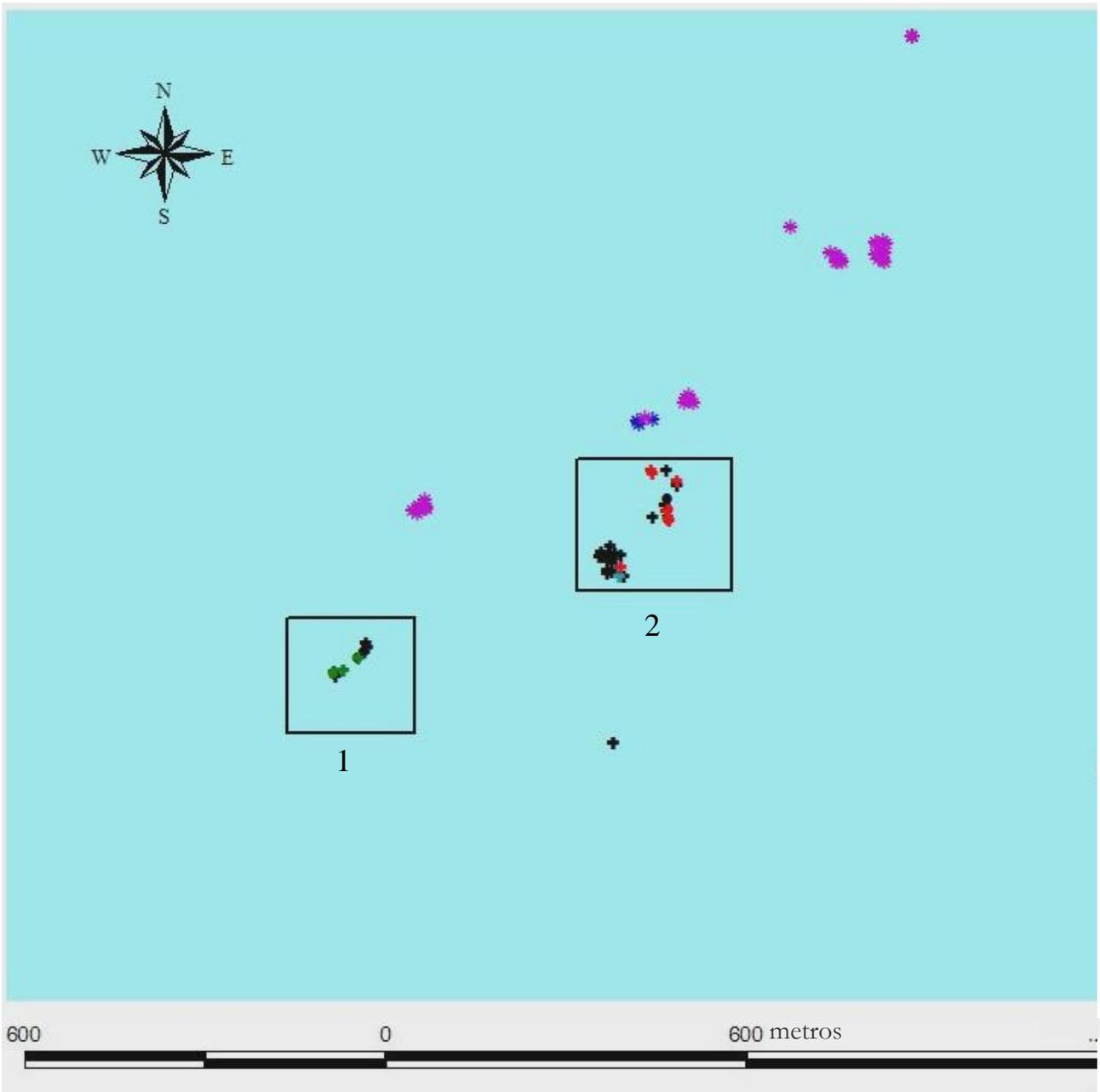
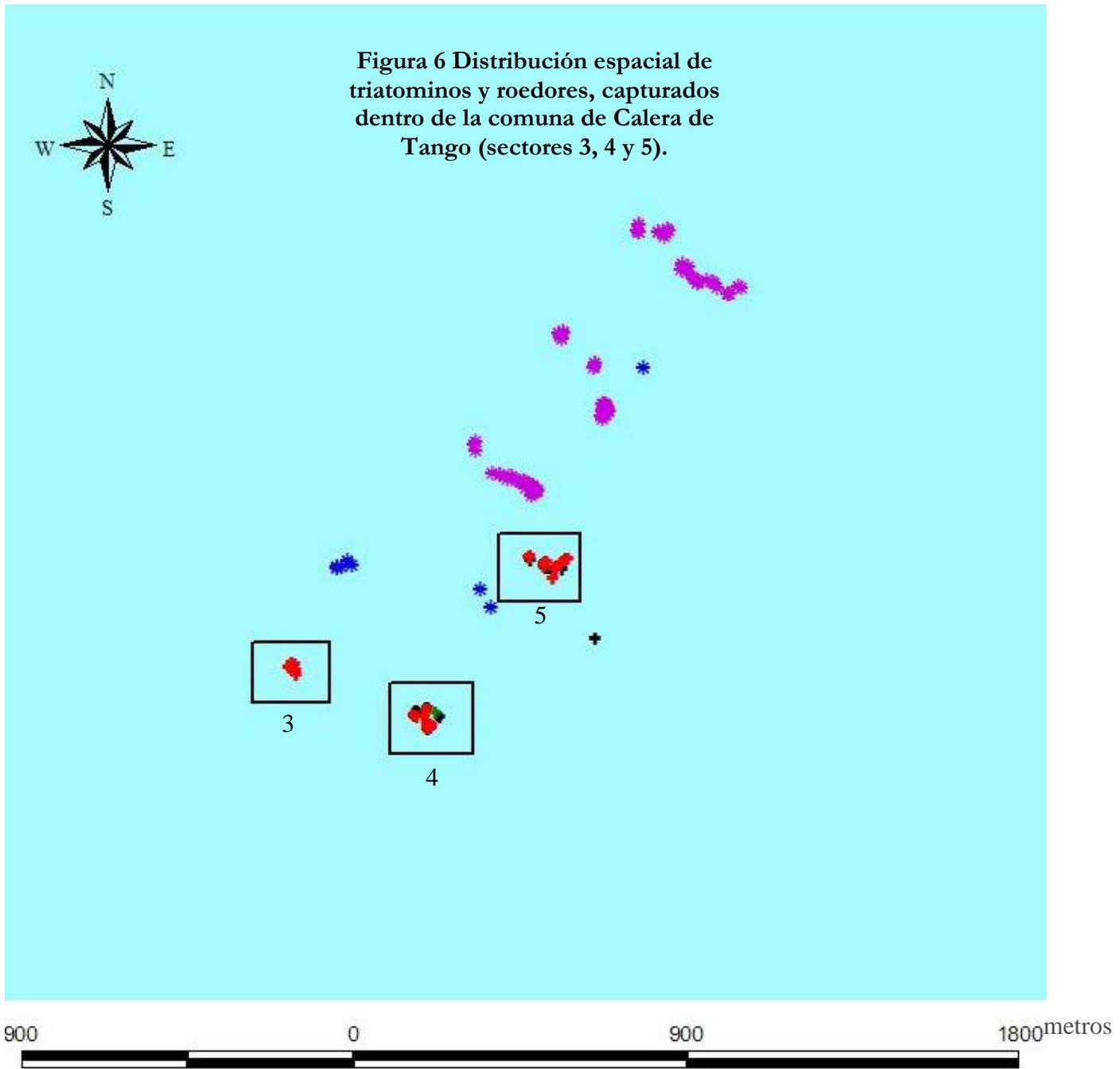


Figura 5 Distribución espacial de triatominos y roedores, capturados dentro de la comuna de Calera de Tango (sectores 1 y 2).

+ *Abrocoma bennetti* (-), + *Abrothrix olivaceus* (-), + *Octodon degus* (-), + *Phyllotis darwini* (-), + *Rattus rattus* (-), • *Octodon degus* (+), • *Phyllotis darwini* (+), • *Rattus rattus* (+)
 * *Triatoma infestans* (-), * *Triatoma infestans* (+)

Calera de Tango

Sector demarcado



+ *Abrocoma bennetti* (-), + *Abrothrix olivaceus* (-), + *Octodon degus* (-), + *Phyllotis darwini* (-), + *Rattus rattus* (-), • *Octodon degus* (+), • *Phyllotis darwini* (+), • *Rattus rattus* (+)
 * *Triatoma infestans* (-), * *Triatoma infestans* (+)

Calera de Tango Sector demarcado

metros

DISCUSIÓN

En este trabajo se pretendió: 1) establecer las especies de roedores presentes en ambas zonas y sus abundancias relativas, 2) establecer la frecuencia de infección por *T. cruzi* en las especies de roedores capturados y finalmente 3) relacionar estas dos variables.

5

1.- Especies presentes.

Las condiciones para que prosperen los roedores son: gran oferta de alimentos, clima auspicioso y baja presencia de depredadores (principalmente aves rapaces y zorros), (Meserve *et al.*, 1993; Muñoz, 2000). La captura puede ser muy exitosa o muy pobre. La captura poco exitosa de roedores puede atribuirse al comportamiento gregario de los mismos, es decir, al hábito de vivir en agrupaciones, que lleva a los animales a tener una distribución focalizada dentro de manchas de vegetación. Así frente a condiciones aparentemente favorables puede haber un bajo éxito de captura por la falta de coincidencia entre el sector de trampeo y la distribución de los roedores. Esto explicaría la baja captura de estos mamíferos, en lugares donde la abundancia real sería mayor a la reflejada en la muestra. Algunos de los especímenes que presentan este tipo de comportamiento, tendiente a la agrupación, son degus, rata común, rata chinchilla, rata olivácea, lauchón orejudo, entre otros (Muñoz, 2000; Coto, 1997). También es importante el tamaño del área donde cada roedor busca su alimento o refugio. Esta se conoce como ámbito de hogar y corresponde a la distancia que recorre una determinada especie en un día y puede determinar el contacto entre individuos de una misma o distinta especie (Muñoz, 2000).

En el caso de nuestro estudio, las especies capturadas no difieren de lo comunicado en la literatura. En Calera de Tango se encontraron cinco especies, incluyendo la rata común. Este hallazgo es interesante porque es demostrativo del impacto de la presencia humana en estos lugares. Las ratas suelen colonizar espacios silvestres y se podría esperar algún nivel de competencia con los roedores autóctonos. Por lo tanto la fauna de micromamíferos puede verse alterada a niveles locales. Podría ser esta una explicación para la menor abundancia relativa de las especies que se capturaron dentro de los mismos sitios que *R. rattus*. (Cattan comunicación personal)²

En la figura 4 de Calera de Tango, se puede apreciar que los animales capturados, fueron atrapados dentro de cinco sectores de trampeo. Al relacionar las distancias de los roedores con los focos de vinchucas, se advirtió (Fig. 5) que el animal más lejano a los focos de los triatominos, guardó una distancia de 750m, que al relacionarlo con el ámbito de hogar de los roedores atrapados durante el presente estudio, es muy probable que las vinchucas (cuyo ámbito de hogar es de hasta de 40m), de los focos previamente reportados se estén alimentando de los roedores del sector, ya que el rango de ámbito de hogar de ellos va desde 1.154m², hasta un máximo de 3.781m². Dentro de las especies con las que se trabajó, es importante destacar a la

² Cattan, PE. 2007[Comunicación personal], U. Chile, Fac. Sc. Veterinarias y Pecuarias.

especie que presenta mayor ámbito de hogar promedio, *R. rattus*, 3.000 m² (Coto, 1997).

2.- Infección por *T. cruzi*.

Uno de los determinantes involucrados en la detección de la infección, es sin duda la sensibilidad de la técnica diagnóstica. Otro de los factores que pueden influir en la positividad de los resultados es que el individuo esté cursando con niveles subpatentes de parasitemia, es decir, baja cantidad de parásitos en la sangre, que sería el caso de los portadores en fase crónica de la enfermedad. La técnica de la PCR ha demostrado ser altamente sensible, para detectar la infección de *T. cruzi* en muestras de sangre. Para los casos crónicos la prueba presenta una especificidad del 100%, siendo la sensibilidad variable. Para aumentar, en estos casos, la sensibilidad de la PCR, habría que emplear una técnica con múltiples primers, con un volumen de al menos 5-10ml de sangre, técnica conocida también con el nombre de PCR anidado o Nested PCR (Rodríguez *et al.*, 2004).

Por otra parte, otro de los determinantes de la infección en los distintos animales es la condición de hematófagas oportunistas, de las vinchucas, es decir, se alimentan principalmente del hospedero más abundante, o del que esté presente. *M. spinolai* se alimenta incluso de más de un hospedero a la vez (Sagua *et al.*, 2000). Al revisar la literatura, encontramos a *O. degu* con 12,9%, mediante xenodiagnóstico en Aucó y en otro estudio en la misma región (21,4%), (Durán *et al.*, 1989), así también en un estudio más reciente (51%)

(Rozas, *et al.*, 2005). En tanto que los resultados de nuestro estudio, muestran menores porcentajes de infección global.

Los registros previos de positividad a *T. cruzi* en *A. bennettii* reportan un máximo de 36,4% en una zona endémica, de la Región de Coquimbo (Durán *et al.*, 1989), mientras en el presente estudio no hubo resultados positivos para la misma especie de roedor.

Dentro de los antecedentes de literatura en cuanto a *P. darwini* sólo se registraron mayores niveles de infección con *T. cruzi* en el estudio de Rozas, *et al.*, (2005) presentando un 45% frente al 37,5% que se obtuvo como promedio para ambas zonas estudiadas en esta investigación. Para las especies que en este estudio no se encontró infección, *A. olivaceus* y *A. bennettii*, existen reportes máximos previos de 59,1% y 36,4%, respectivamente. Es de notar que en la investigación, de Rozas *et al.*, 2005 el número de roedores por especie fue mucho mayor que en el nuestro, lo cual posiblemente afectó el resultado obtenido.

Entonces si relacionamos: el hábitat donde se establecieron los focos de triatominos, junto con la fauna del mismo sector y además considerando el oportunismo alimentario del insecto, correspondería que entraran a su espectro de alimentación, diversos tipos de animales, y uno de los que se encuentran en el sector son los roedores, protagonistas de este estudio.

Frecuencia de infección vs abundancia de hospedero.

Octodon degus y *Rattus rattus* fueron las especies que se capturaron en mayores proporciones, lo que estaría indicando, que en el momento de realizar el muestreo, eran las especies más abundantes. Este hecho hace que la fuente de micromamíferos, en nuestro caso roedores, de mayor disponibilidad como fuente alimentaria para los triatomíneos fueran *O. degus* y *R. rattus*, lo que coincide con que la mayor prevalencia del parásito fuera en éstas especies.

Al relacionar los puntos anteriores, hematofagismo oportunista de las vinchucas, abundancia relativa de los roedores y ámbito de hogar, podemos explicar que las especies más abundantes fueran las con mayores porcentajes de infección con el parásito.

Frecuencia de los clones

El análisis de las muestras positivas por especie, amplificadas por la técnica de PCR y su posterior hidridización mediante sondas de ADN, arrojó que el 100% de las muestras de la especie *R. rattus* (10/10) correspondieron al clon TcI (silvestre), sin embargo en la especie *O. degus*, se encontraron ambos clones, 28,57% (2/7) del TcI y 42,86 (3/7) del TcII (domiciliario). (Cuadro 3)

Cabe recordar que todas las especies estudiadas fueron capturadas en lugares cercanos a focos de *T. infestans*, los que fueron encontrados en estudios previos realizados en el mismo sector, figuras 4, 5 y 6 (Bacigalupo *et al.*, 2006).

Si se relacionan las distribuciones clonales de *T. cruzi* encontradas en ambas especies de roedores con el hallazgo previo de focos de *T. infestans* en los

lugares de captura, una de las posibles respuestas a esta observación, podría ser que *R. rattus* al ser un animal sinantrópico, haya tenido por un lado mayor contacto con los insectos vectores domiciliarios parasitados o exposición mucho más antigua a la infección, logrando controlar inmunológicamente o genéticamente el clon TcII, eliminándolo de su circulación sanguínea selectivamente con respecto a TcI. En cambio *O. degus*, presentó ambos clones, lo que pudiera atribuirse a sus hábitos silvestres (Muñoz, 2000), que lo han mantenido alejado a la exposición de los triatomíneos domésticos y por lo tanto a la infección por *T. cruzi*. Además, si consideramos a lo anterior, la reciente colonización de estos sectores silvestres por parte de los triatomas domiciliarios (Bacigalupo *et al.*, 2006) y a un contacto ocasional con estos animales de esta especie, su selección clonal no sería específica dado al reciente contacto con el *T. cruzi*.

CONCLUSIONES

La frecuencia de *T. cruzi* en sangre de roedores silvestres y cosmopolitas, en Calera de Tango y Til Til, durante los meses de Enero y Abril del 2005, determinada mediante la técnica de PCR fue 14,84%.

Las especies de roedores presentes, en ambas comunas, Calera de Tango y Til Til, con sus respectivas abundancias relativas, fueron 53,28% y 87,5% para *O. degus* y 3,28% y 12,5% para *P. darwini*. En Calera de Tango se encontraron además en un 40,16% ejemplares de la especie *R. rattus*, y 1,64% tanto para *A. bennetti* como para *A. olivaceus*.

La frecuencia de infección, para cada especie fue 27,73% para *R. rattus*, 11,67% para *O. degus*, 33,33% para *P. darwini*, *A. bennetti* y *A. olivaceus* no presentaron seropositividad.

Al comparar los resultados, se comprobó que las especies con mayores abundancias, (*O. degus* 57,25% y *R. rattus* 35,51%) fueron las que tuvieron mayores prevalencias para *T. cruzi* (11,67 % y 27,73% respectivamente).

Los resultados al mostrar la presencia del parásito en la población muestreada, se puede concluir que los triatomíneos infectados están alimentándose de la sangre de roedores (silvestres y sinantrópicos), lo que lleva a que *T. cruzi* esté parasitando a estos mamíferos, contribuyendo al mantenimiento del ciclo silvestre y peridoméstico del parásito, en las comunas estudiadas en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

ANDRADE, S.; MAGALHÃES J. 1997. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 30 (1) 27-35.

APT, W.; REYES, H. 1986. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Chile II: infección en animales, algunas características especiales del problema, el control. Parasitología al día 10: 129-133.

APT, W.; REYES, H. 1990. Algunos aspectos de la Enfermedad de Chagas en Latinoamérica. Parasitología al día 18: 82-87.

AUFDERHEIDE A. C., SALOW., MADDEN M., STREITZ J., BUIKSTRA J., GUHL F., ARRIAZA B., RENIER C., WITTMERS, . L. E JR., FORNACIARI G. AND ALLISON M. 2003. A 9,000-year record of Chagas' disease. PNAS 101 (7): 2034-2039.

BACIGALUPO, A., SEGURA J.A., GARCÍA 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. Med. Chile. 134: 1230-1236.

BARR, S.; BROWN, C.; DENNIS, V.; KLEI, T. 1991. The lesions and prevalence of *Trypanosoma cruzi* in opossums and armadillos from Southern Louisiana. *Journal Parasitology* 77 (4): 624-627.

BURLEIGH B. A.; ANDREWS, N. W. 1995. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annual Review of Microbiology*, 49: 175-201.

CALDERON-ARGUEDAS, OLGER, CHINCHILLA, MÍSAEL, GARCIA, FENMADO. 2001. Preferencias alimentarias de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) procedente de la meseta central de Costa Rica a finales del siglo XX *Parasitología al Día* 25(3-4): 78-81.

CANALS, M.; EHRENFELD, M.; SOLIS, R.; CRUZAT, L.; PINOCHET, A.; TAPIA, C.; CATTAN, P.E. 1998. Biología comparada de *M. spinolai* en condiciones de laboratorio y terreno: cinco años de estudio. *Parasitología al día* 22: 72-78.

CANALS, M.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.E. 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(10): 1108-1112.

CANALS, M.; CRUZAT, L.; MOLINA, M.; FERREIRA, A.; CATTAN, P. 2001. Blood host sources of *mepraia spinolai* (heteroptera: reduviidae), wild vector of Chagas disease in Chile. *Journal of medical Entomology* 38 (2): 303-307.

CASTAÑERA, M. B.; LAURICELLA, M. A.; CHUIT, R.; GÜTLER, R. E. 1998. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. *Annals of tropical medicine & Parasitology* 92 (6):671-683.

CATTAN P.; PINOCHET, A.; C. BOTTO-MAHAN, MARIANA I ACUÑA, MAURICIO CANALS, 2002. Abundance of *mepraia spinolai* in a periurban zone of Chile. *Memorias do instituto Oswaldo Cruz* 97 (3): 285-287.

COTO, H. 1997. *Biología y control de ratas sinantrópicas.* Buenos Aires, Abierta. 207p.

CRUZAT M. L., 1997. Perfil alimentario de *Triatoma spinolai* en el peridomicilio de una zona de riesgo epidemiológico perteneciente a la Región Metropolitana. Memoria Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile 55 p.

DE LIMA, H.; CARRERO, J.; RODRÍGUEZ, A.; DE GUGLIELMO, Z.; RODRÍGUEZ, N. 2006. Trypanomastidae de importancia en salud pública en animales silvestre y sinantrópicos en un área rural del municipio Tovar del estado de Mérida, Venezuela. *Biomédica* 26 (1): 42-50.

DOMÍNGUEZ, A.; ESPINOZA, E. 1988. Estudio de reservorios silvestres de *Trypanosoma cruzi* en el estado de Oaxaca, México. *Bol. Chil. Parasitol* 43: 64-65.

DOMÍNGUEZ A.; RICARDEZ J.; ESPINOZA E. 1990. Estudio de reservorios silvestres del *Trypanosoma cruzi* en la reserva ecológica de “el zapotal”, Chiapas, México. *Bol. Chil. Parasitol.* 45: 8-12

DURÁN, J.; VIDELA, M.; APT, W. 1989. Enfermedad de Chagas en una comunidad de pequeños mamíferos simpátricos de la reserva nacional Las chinchillas. *Parasitología al día* 13(1): 15-20.

FERNANDES, A.; DIUTAIUTI, L.; DIAS, JC.; ROMANHA, A.; CHIARI, E. 1994. Inter-relações entre os ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no municipio de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. *Cadernos de saúde Pública.* 10: (4) 473-480.

FLORES, B.; HERNÁNDEZ, G.; LEPE, A.; CONTRERAS M. DEL C.; SANDOVAL, L.; VILLARROEL, F.; ROJAS, A.; GONZÁLEZ, O.; SCHENONE, H. 1984. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile, sectores rurales, infestación triatomídea domiciliaria e infección por *Trypanosoma cruzi* de los vectores y mamíferos domésticos de la V Región Bol. Chile. Parasit.. 39: 62-65.

FRIAS, D.; HENRY A., GONZALEZ C.R. 1998. *Mepraia gajardoi*: a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia spinolai*. Revista Chilena de Historia Natural 71: 177-188.

FRÍAS, D. 2004. Formación de nuevas especies de los géneros *Mepraia* (Hemiptera: Reduviidae) y *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) y su relación con modificaciones de los patrones heterocromáticos y mutaciones sistémicas. [en línea] I + I Informes de investigación N° 5. Santiago, Octubre 2004 <http://www.umce.cl/investi/i_mas_i_d_frias.htm>. [consulta 4 septiembre 2007].

GARCÍA, A., 2001. Diagnóstico de la infección transplacentaria de *Trypanosoma cruzi* por medio de la técnica de reacción de la polimerasa, su aplicación en la evaluación del tratamiento médico y análisis genético-epidemiológico de las cepas infectantes. Tesis (Magíster en Ciencias Biológicas, mención en Parasitología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Escuela de Postgrado. 74p.

GARCIA, A.; BAHAMONDE, M. I.; VERDUGO, S.; CORREA, J.; PASTENE, C.; SOLARI, A.; TASSARA, R.; LORCA, M. 2001. Infección transplacentaria por *Trypanosoma cruzi*: Situación en Chile. Rev. Méd. Chile, (129): 330-332.

GÜRTLER , M.; CÉCERE , R.; PETERSEN , R.; RUBEL, M.; SCHWEIGMANN, N. 1993. Chagas disease in north-west Argentina: association between *Trypanosoma cruzi* parasitaemia in dogs and cats and infection rates in domestic *Triatoma infestans*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 87: 12-15.

JIMÉNEZ, J.; LORCA, M. 1990. Tripanosomiasis americana en vertebrados silvestres y su relación con el vector *Triatoma spinolai*. Arch Med Vet XXII: 179-183.

KNIERIM, F.; CASTRO, M.; VILLARROEL, F.; SCHENONE, H., 1976. Estudio preliminar sobre la fuente de alimentación de *triatoma infestans* y *triatoma spinolai* mediante la reacción de doble difusión en gel Bol. Chile. Parasitol. 31: 34-36, 1976.

LAINSON, R.; SHAW, J; FRAIHA, H.; MILES, M.; DRAPER C. 2004, Chagas's disease in the Amazon Basin: I. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Pará, North Brazil Trans R Soc Trop Med Hyg. 73 (2): 193-204.

MAEKELT, G. A. 1983. La epidemiología de la Enfermedad de Chagas en relación con el ecosistema domiciliario. Interciencia 1(6):353-36.

MESERVE, P.; GUTIÉRREZ, J.; JAKSIC, F. 1993. Effects of vertebrate predation on a caviomorph rodent, the degu (*Octodon degus*), in a semiarid thorn scrub community in Chile. Oecologia 94 (2): 153-158.

MONCAYO, A. 1999. Progreso en la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas en los países del cono sur. Medicina (Buenos Aires), 59 (Supl.II): 120-124

MORTON B, ABBOT D, BARCLAY R, CLOSE BS, EWBANK R, HEATH M, GASK, D.; MATTIC, S.; POOLE, T.; SEAMER, J.; MORTON, ; SOUTHEE, J.; THOMPSON, A.; TRUSSEL, C.; JENNINGS, W.; JENNINGS, M. 1993. Removal of blood from laboratory mammals and birds. First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim* 27:1-22.

MUÑOZ, A. 2000. Orden Rodentia. En: Mamíferos de Chile. Valdivia, Chile. Ediciones Cea. 73-126 pp.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), 2002. Serie de Informes Técnicos 905, Control de la enfermedad de Chagas. Segundo informe del comité de expertos de la OMS Ginebra.117p.

RAMIREZ, L.; LAGES-SILVA, E.; ALVARENGA-FRANCO, F.; MATOS, A; VARGAS, N.; FERNANDES, O.; ZINGALES, B. 2002, High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in southeast Brazil. *Acta Tropica* 84: 189-198.

RAVINOVICH, J.; SCHWEIGMANN, N.; YOHAL, V.; WISNIVESKY-COLLI, C. 2001. Probability of *trypanosome cruzi* transmission by *triatoma infestans* (hemiptera: reduviidae) to the opossum *didelphis albiventris*(marsupialia: didelphidae). Am. J. Trop. Med. Hyg., 65 (2): 125-130.

RENGIFO MAUREIRA, A. 2000. Preferencias alimentarias específicas de *Mepraia spinolai* por vertebrados frecuentes en su área. Memoria Título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile 68 p

REYES L, SILESKY E, CERDAS C, CHINCHILLA M, GUERRERO O M. 2002. Presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en perros de Costa Rica. Parasitol Latinoamer 57: 66-8.

RODRÍGUEZ, E.; BRICEÑO, L.; CHIURILLO, MA.; MOSCA, W; CAMPOS, Y. 2004, Tripanosomiasis americana: Aspectos teóricos. Curso latinoamericano sobre enfermedades infecciosas. Curso Latinoamericano sobre enfermedades infecciosas, 25 de octubre – 12 de Noviembre. 2004. Instituto de Biomedicina, Universidad Central, Caracas, Venezuela. 27p.

ROZAS, M.; BOTTO- MAHAN, C.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.; SOLARI, A. 2005. Short report: trypanosoma cruzi infection in wild mammals from a chagasic area of Chile. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene Am. J. Trop. Med. Hyg., 73(3): 517-519.

SAGUA, H; ARAYA, J.; GONZÁLEZ, J; NEIRA, I. 2000. *Mepraia spinolai* in the southeastern pacific ocean coast (Chile) first insular record and feeding pattern on the Pan de Azúcar Island. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95 (2): 167-170.

SALVATELLA, R; GONZÁLEZ, J., 1986. Reservorios animales de *Tripanosoma cruzi* en Uruguay. *Rev. Med. Uruguay* 2: 101-105.

SCHENONE, H., CHRISTENSEN H., DE VÁSQUEZ, AM. GONZALEZ, C.; VILLARROEL, E. 1985. Fuentes de alimentación de triatomas domésticos y su implicancia epidemiológica en relación a enfermedad de Chagas en áreas rurales de siete regiones de Chile. *Boletín Chileno de Parasitología* 40: 34-38.

SCHOFIELD, CJ, DIOTAIUTI, L., AND DUJARDIN, JP. 1999. The process of domestication in Triatominae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 375-378.

SCHWEIGMANN, N.; PIETROKOVSKY, S.; BOTTAZZI, V.; CONTI, O. WISNIVESKY-COLLI, C. 1995. Interaction between *Didelphis albiventris* and *Triatoma infestans* in Relation to *Trypanosoma cruzi* Transmission Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 90 (6): 679-682

SCHWEIGMANN, N.; PIETROKOVSKY, S.; BOTTAZZI, V.; CONTI, O.; BUJAS, M.; WISNIVESKY-COLLI, C. 1999. Estudio de la prevalencia de la infección por *Trypanosome cruzi* en zarigüeyas (*Didelphys albiventris*) en Santiago del Estero, Argentina. Rev Panamericana de Salud Pública 6 (6): 371-377.

SOLÍS, H.; DE CARVALHO, E.; FERREIRA, C.; CASSANOVA, C.; HUANÁN, A.; MENDOZA, V. 2003. Contribución al estudio de la epidemiología de la enfermedad de Chagas en tres localidades de la zona sur de Perú. Anales de la facultad de medicina, 64 (4):223-227.

TRASLAVIÑA, M. 1984. Estudio de la Enfermedad de Chagas en caninos sinantrópicos domésticos en un área hiperendémica (valle del Choapa, IV Región, Chile). Tesis para optar al título de médico Veterinario de la Universidad de Chile 53 págs.

ULLOA, M. 1984. Enfermedad de Chagas en caprinos sinantrópicos de la provincia del Choapa, IV Región, Chile. Tesis para optar al título de médico Veterinario de la Universidad de Chile 44 páginas.

URDANETA-MORALES, S.; NIRONI, I., 1996. *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of urban opossums. I- isolation and experimental infectins. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 91(4): 399-403.

VAN OVERTVELT, L., VANDERHEYDE, N., VERHASSELT, V., ISMAILI, J., DE VOS, L. GOLDMAN, M., WILLEMS, F. AND VRAY, B., 1999. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of citokines, HLA-DR, and cosmulatory molecules. Infect Immun Aug 67: 4033-4040.

VARGAS, F., 2005. Epidemiología molecular de la tripanosomiasis Americana (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*) en la región norte y nororiental del Perú. Tesis doctoral, Facultad de ciencias, Universidad de Granada 116p

VAZQUEZ, D.; CANALE, D.; GÜRTLER, R., 1999. Effects of Non-Susceptible Hosts on the Infection with *Trypanosoma cruzi* of the Vector *Triatoma infestans*: an Experimental Model. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94(3): 413-419.

VENEGAS, L.; ROJAS, A., VILLARROEL, F; CONTRERAS, M. del C.; SANDOVAL, L.; SCHENONE, H. 1984. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile. Sectores rurales. Infestación triatomídea domiciliaria e infección por *trypanosoma cruzi* del vector y mamíferos domésticos de la VI Región del Libertador General Bernardo O'higgins. *Bol. Chil. Parasit.* 39: 69-72.

VILLARROEL, F.; ROJAS, A.; CONTRERAS, M° DEL C.; SCHENONE, H. 1984. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile. sectores rurales. infestación triatomídea domiciliaria e infección por *Trypanosoma cruzi* de los vectores y mamíferos domésticos de la Región Metropolitana, 1982-1984. *Bol. Chil. Parasit.* 39: 65-68.

WISNIVESKY-COLLI, C.; SCHWEIGMANN, N.; ALBERTI, A.; PIETROKOVSKY, M.; CONTI, O.; MONTOYA, S., RIARTE, A.; RIVAS, C., 1992. Sylvatic American trypanosomiasis in Argentina. *Trypanosoma cruzi* infection in mammals from the Chaco forest in Santiago del Estero. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 86(1): 38-41

YAEGER, R., 1988. The prevalence of *Trypanosoma cruzi* in armadillos collected at a site near New Orleans, Louisiana. Am J Trop Med Hyg. 38(2): 323-6.

ZELEDÓN, R., 1983. Vectores de la Enfermedad de Chagas y sus características ecofisiológicas. Interciencia 8 (6):384-392.