



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“PREVALENCIA DE GENOTIPOS (CLONES) DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN MICROMAMÍFEROS, MODULADA POR LA PRESENCIA DE DISTINTOS VECTORES, EN SECTORES ENDÉMICOS DE TRES REGIONES DE CHILE”

CRISTINA INÉS KRESTCHMER PADILLA

Memoria para optar al Título profesional
de Médica Veterinaria
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUIA: PEDRO EDUARDO CATTAN AYALA

SANTIAGO, CHILE

2010



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“PREVALENCIA DE GENOTIPOS (CLONES) DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN MICROMAMÍFEROS, MODULADA POR LA PRESENCIA DE DISTINTOS VECTORES, EN SECTORES ENDÉMICOS DE TRES REGIONES DE CHILE”

CRISTINA KRESTCHMER PADILLA

Memoria para optar al Título profesional
de Médica Veterinaria
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

NOTA FINAL:.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA: PEDRO EDUARDO CATTAN AYALA
PROFESOR CONSEJERO: ALDO SOLARI ILLESCAS
PROFESOR CONSEJERO: FERNANDO FREDES MARTINEZ

SANTIAGO, CHILE

2010

*Dedico esta memoria a mí querido hijo Leonardo,
Quien acompaña, mantiene y engrandece todos mis esfuerzos.*

*Agradezco cada gesto y acto educativo tanto académico como
extra-académico que fueron entregados por integrantes de nuestra
comunidad, los que me han permitido obtener valiosas competencias
personales y profesionales.*

RESUMEN

Se investigó la presencia de clones del parásito *Trypanosoma cruzi*, en tres zonas consideradas endémicas para la enfermedad de Chagas en Chile.

Estas áreas investigadas presentaban un determinado patrón de distribución para los vectores del parásito; *Triatoma infestans* en Calera de Tango (Región Metropolitana), *Mepraia spinolai* en Reserva Nacional Las Chinchillas (Región de Coquimbo) y la existencia de ambos vectores en Putaendo (Región de Valparaíso).

Sé capturó un total de 113 micromamíferos de las 3 áreas, incluyendo ejemplares de *Abrocoma bennetti*, *Abrothrix longipilis*, *Abrothrix olivaceus*, *Octodon degus*, *Phyllotis darwini*, *Thylamys elegans*, *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus*, *Oligoryzomys longicaudatus*.

Para detectar a los individuos parasitados se realizó la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) de muestra de sangre obtenida mediante punción cardíaca, posteriormente las muestras que resultaron positivas a la PCR, se tipificaron mediante la prueba Southern blot hibridando con sondas específicas para determinar cuál clon de *T. cruzi* presentaban los micromamíferos parasitados.

Se detectó la presencia de *T. cruzi* en 28 (24,7%) de las 113 muestras totales, en donde 26 individuos (93%) presentaron una infestación única por el clon DTU 1 (TcI) de *T. cruzi*, y 2 individuos (7%) presentaron una infestación mixta por los clones DTU 1 (TcI) y DTU 2 (TcIIe).

ABSTRAC

We investigated the presence of the parasite *Trypanosoma cruzi* clones in three areas considered endemic for Chagas disease in Chile.

These surveyed areas showed a specific pattern of distribution for the vectors of the parasite: *Triatoma infestans* in Calera de Tango (R. Metropolitan), *Mepraia spinolai* in Reserve National Las Chinchillas (Coquimbo Region) and the existence of two vectors in Putaendo (Valparaiso Region).

I caught a total of 113 small mammals in the 3 areas, including specimens of *Abrocoma bennetti*, *Abrothrix longipilis*, *Abrothrix olivaceus*, *Octodon degus*, *Phyllotis darwini*, *Thylamys elegans*, *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* and *Oligoryzomys longicaudatus*.

To detect parasitized individuals I used, the polymerase chain reaction technique (PCR). Sample of blood were obtained by cardiac puncture. The samples positive for PCR test were typed by Southern blot hybridizing with probes to determine specific clone of *T.cruzi* parasite indifferent small mammals.

I detect the presence of *T. cruzi* in 28 (24,7%) of the 113 total samples, 26 individual (93%) had a single infection by clone DTU 1 (TcI) of *T. cruzi*, and 2 other (7%) presented a mixed infection by clones DTU 1 (TcI) and DTU 2 (TcIIe).

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. Ésta afecta al ser humano e infecta también a mamíferos silvestres y domiciliarios.

Es una zoonosis transmitida principalmente por vectores triatominos, conocidos comúnmente como vinchucas. De éstas, las especies más relevantes y estudiadas en Chile han sido dos: *Triatoma infestans* Klug, 1934 y *Mepraia spinolai* Porter, 1934.

El parásito para lograr sobrevivir a nivel ambiental necesita transitar por un ciclo biológico que dependiendo de los distintos hospederos puede presentarse de dos maneras: el silvestre y el doméstico (Figura 2). El primero se constituye cuando los vectores transmiten el parásito entre comunidades de mamíferos silvestres, sin mayor riesgo para el hombre; en Chile este ciclo se ha asociado con *M. spinolai*, en tanto que el ciclo doméstico da cuenta de la transmisión entre animales domésticos o sinantrópicos y el hombre, que para nuestro país se ha asociado con *T. infestans*.

No obstante de esta separación se han reportado focos de *T. infestans* “asilvestradas” y de roedores asociados a ellas infectadas por *T. cruzi*.

Trypanosoma cruzi, al ser un protozoo de reproducción asexual genera poblaciones en forma de clones, pudiendo tener cada uno distintas expresiones clínicas y epidemiológicas según el hospedador en que se encuentre. Por ser una enfermedad muy importante para América Latina es necesario investigar las posibles interacciones que puedan existir entre la estructura genético-poblacional del protozoo y sus distintos hospedadores, y así determinar la importancia de cada entidad en su contexto tanto ecológico como epidemiológico.

Se le debe dar una real importancia al análisis de los clones circulantes a nivel silvestre e intentar comprender la distribución de estos en la naturaleza, investigando y descubriendo posibles fenómenos de evolución y adaptación que se puedan presentar

para la supervivencia de dicho organismo, todo esto para cuantificar el nivel de riesgo para la especie humana de contraer la enfermedad de Chagas y las posibles repercusiones ecológicas de las nuevas adaptaciones de *T.cruzi*. Debemos considerar ciertas variables de interés como lo son: por un lado el impacto presente con los programas de desinsectación de viviendas, ya que generan presión para que el vector *T.infestans* se “asilvestre”, y por otra parte el hecho de que las distintas poblaciones de *T. cruzi* seguirán presentes en los reservorios silvestres ya que estos hospederos naturales no se pueden controlar en su hábitat silvestre.

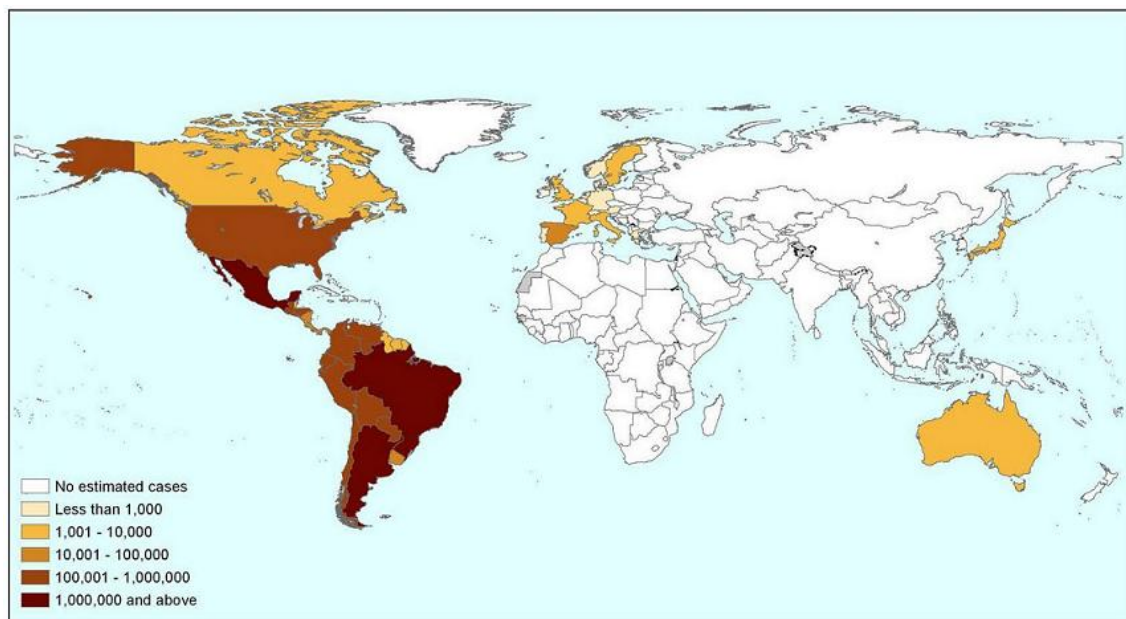
En este escenario es importante el trabajo que se reporta en esta memoria, ya que es una aproximación para dilucidar y entender la distribución de los clones del parásito *T. cruzi* en los reservorios silvestres, al relacionar tal distribución con una determinada distribución de especies vectoras: *T. infestans* en área 1, *M. spinolai* en área 2, y presencia de ambas vinchucas en el área 3. Para los fines de análisis estadístico esta distinta distribución de especies vectoras por área se considerara como “tratamiento vectorial presentado de forma natural, por área”.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1) La Enfermedad

La enfermedad de Chagas también conocida como tripanosomiasis americana, fue descrita en 1909, por el doctor Carlos Chagas, Brasil (Chagas, 1909).

Actualmente la infección se encuentra en forma natural en el continente americano desde el sur de California (paralelo 43 latitud norte), por Latinoamérica, hasta la región central de Argentina (paralelo 49 latitud sur), en estas zonas habitan los vectores biológicos (OMS, 2002). Pero también se ha notificado la enfermedad de Chagas en otros países a nivel mundial la distribución se muestra en la siguiente imagen.



Sources:
1. OPS/HDM/CD/425-06 Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas.
2. Gueri-Guttenberg RA, Grana D.R., Giuseppe Ambrosio, Milei J. Chagasic cardiomyopathy: Europe is not spared! *European Heart Journal* (2008); 29: 2587-2591.
3. Schmunis G. A. Epidemiology of Chagas Disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 102(Suppl. I): 75-85, 2007.*
4. De Ayala A.P., Pérez-Molina J.A., Norman F., and López-Vélez R. Chagasic cardiomyopathy in immigrants from Latin America to Spain. *Emerging Infectious Disease Volume 15, Number 4—April 2009.*
5. According to the numbers of immigrants registered for 2007 in the website of the Japanese Ministry of Justice and estimated seroprevalence for non endemic countries according to Paricio-Talayero J.M. Vigilancia epidemiológica de la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas en tres maternidades de la Comunidad Valenciana. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008;26(10):609-13.

Figura 1.- Distribución mundial de la población infectada con *T. cruzi*.

(Fecha de consulta 22/09/2010)

Esta zoonosis parasitaria existe en el continente americano desde hace más de 9.000 años, ya que se ha documentado infección chagásica en comunidades prehistóricas del norte de Chile (Apt y Reyes, 1986).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la enfermedad de Chagas afecta entre 16 y 18 millones de personas, con unos 100 millones de personas (25% de la población de Latinoamérica) que estarían en riesgo de contraer la enfermedad, matando anualmente a cerca de 50 mil personas (Carlier, 2003).

La enfermedad puede manifestarse en forma aguda y/o crónica. La forma aguda es, en general, una enfermedad febril leve, debida a la infección reciente por el microorganismo. Tras la resolución espontánea de la forma aguda del proceso, la mayor parte de los infectados permanecen durante toda su vida en una fase indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica, caracterizada por parasitemia subclínica, anticuerpos contra *T. cruzi* fácilmente detectables y ausencia de síntomas, esta fase indeterminada, es también denominada fase latente por algunos autores y reconocida como tal por el Ministerio de Salud (Apt y Reyes, 1986). Una minoría de personas con infección crónica latente, desarrolla lesiones cardíacas y gastrointestinales que pueden provocar manifestaciones graves y la muerte (Kirchhoff, 1993).

Con frecuencia, aparece una lesión inflamatoria indurada, llamada Chagoma, en el lugar de entrada del parásito, posterior a la picadura por parte de un triatomino infestado. Los cambios histológicos locales consisten en la presencia de parásitos intracelulares en los leucocitos y las células del tejido subcutáneo, edema intersticial, infiltración linfocitaria e hiperplasia reactiva de los linfonódulos adyacentes. Con la diseminación del parásito a través de los linfocitos y de la circulación sanguínea, los músculos, incluido el miocardio, pueden resultar intensamente parasitados. Los pseudo-quistes característicos presentes en los cortes de los tejidos infectados son acumulaciones intracelulares de parásitos en fase de multiplicación (Kirchhoff, 1993).

La Enfermedad de Chagas tiene la complejidad de ser una enfermedad transmisible que evoluciona a la cronicidad y que causa discapacidad (25% de los pacientes) y muerte (Organización Panamericana de la Salud, 2007).

La cantidad de gente expuesta en Chile, corresponde aproximadamente a 850.000 personas. Se estima que el número de personas infectadas en esta área sería de 142.000

aproximadamente. La población que habita zonas endémicas es el 77% de la población total del país, esta se encuentra distribuida desde el límite norte del país (frontera con Perú) hasta la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins por el sur (Olea, 2007).

La mortalidad se ha mantenido relativamente estable en los últimos años (0,35-0,40 por cien mil habitantes), lo que equivale a aproximadamente 50 a 60 muertes al año (Thiermann, 2004). Las muertes por Chagas representan el 0,07% de las muertes totales anuales. El 62% son hombres y el 96% corresponde a personas mayores de 45 años; 71% sobre los 65 años. Desde 1988 no se registran muertes en menores de 5 años. La tasa más alta corresponde a la Región de Coquimbo: 20 por cien mil (Olea, 2007).

Al analizar los diagnósticos de causa de muerte, se ve que la cardiopatía chagásica es la más frecuente (76%), seguida de las afecciones del tubo digestivo (22%). El Chagas agudo que en el periodo 1997-2000 representaba el 2,5% de las muertes por Enfermedad de Chagas, en el periodo 2001-2004 representa solo el 0,8% (Olea, 2007).

La enfermedad de Chagas continúa siendo un problema de salud pública en nuestro país. Si bien se interrumpió la transmisión por *T. infestans*, en el año 1996 se han reportado hallazgos de especímenes “Asilvestrados” de ésta, que podrían reivindicarla como potencialmente peligrosa (Bacigalupo *et al.*, 2006). Además de lo anterior, aún persisten dos factores de propagación como son la transmisión congénita y la existencia de *M. spinolai* (vinchuca silvestre) en todo el área endémica chilena; esta última podría ser causante directa mediante picadura o indirecta de nuevas infecciones, por medio de consumo de productos de origen animal provenientes de animales infectados con *T. cruzi* (Olea, 2007).

2) Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas, se puede realizar distintos tipos de métodos diagnósticos, los cuales se presentan agrupados a continuación en dos grandes clasificaciones, métodos indirectos y métodos directos.

Métodos indirectos
Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)
Reacción de Inmunofluorescencia (RIFI)
Hemoaglutinación indirecta
Reacción de anticuerpo lítico
Reacción de fijación del complemento
Acoplamiento de los anticuerpos

Métodos directos
Frotis sanguíneo
Gota gruesa
Análisis de extendido de la capa blanca
Triple centrifugación
Centrifugación con silicona líquida
Microstrout
Lamina laminilla
Xenodiagnóstico
Hemocultivo
Inoculación en animales sensibles
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 de 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 estado de mayor 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 el examen (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 constituido por una red de maxicirculos y minicirculos, donde se encuentra el 20 % del genoma del *T. cruzi*. Los maxicirculos son moléculas de ADN circular homogéneas, mientras que los minicirculos son heterogéneas 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 basados en secuencias provenientes de ADNk (Rodríguez, *et al.*, 2004).

Existen diversos oligonucleótidos partidores para cada una de estas zonas del ADN, siendo los más utilizados, debido a su alta especificidad y sensibilidad, los partidores 121 y 122. Estos amplifican la región hipervariable de los minicirculos 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 utiliza pequeñas cantidades de muestra, manteniendo alta sensibilidad y especificidad. Además puede ser aplicada en cualquier especie animal (Rodríguez *et al.*, 2004).

3) Epidemiología

La Enfermedad de Chagas es una zoonosis producida por el parásito protozoario *T. cruzi*, ampliamente distribuido en Latinoamérica, donde constituye un importante problema de salud pública (Reyes *et al.*, 1998). Afecta a 17 países, con no menos de 12 millones de personas infectadas procedentes de las áreas urbanas y periurbanas (Apt y Reyes, 1983) (Figura 1).

Actualmente la infección se encuentra en forma natural en el continente americano desde el sur de California (paralelo 43 latitud norte), hasta la región central de Argentina (paralelo 49 latitud sur), en estas zonas habitan los vectores biológicos (OMS, 2002).

La enfermedad se ha encontrado con más frecuencia en las regiones descubiertas, tipo sabana, de Centro y Sudamérica, tales como los llanos de Venezuela y Colombia, el norte chico de Chile, los cerrados de Brasil, el chaco del norte de Argentina, el sur de Bolivia y el oeste de Paraguay (Schofield, 1994).

En Chile la enfermedad de Chagas es endémica desde la región de Arica y Parinacota hasta la región del Libertador General Bernardo O'Higgins (Schenone *et al.*, 1991).

En países del cono sur de América Latina se ha desarrollado un plan de eliminación del principal vector, *T. infestans*, a través de fumigaciones de casas infestadas y sus alrededores, como corrales, pircas, etc. (OMS, 2002), el cual actualmente se sigue realizando.

Es posible suponer que el parásito circuló transmitiéndose primero en mamíferos y vectores silvestres para luego adaptarse al ciclo doméstico, favorecido por el desarrollo de la vida sedentaria de las tribus precolombinas y sus viviendas más duraderas dando origen así a los dos ciclos que hoy existen (Neghme y Román, 1948).

El ciclo silvestre 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 nula acción patológica del protozoo sobre sus hospederos silvestres (Rodríguez *et al.*, 2004).

El ciclo doméstico posee fundamental importancia por la expresión de la infección chagásica en el hombre, haciendo que éste sobresalga como principal reservorio de la infección dentro de este ciclo (OMS, 2002). A continuación se expone de forma gráfica los dos ciclos biológicos por los que circula *T. cruzi*.

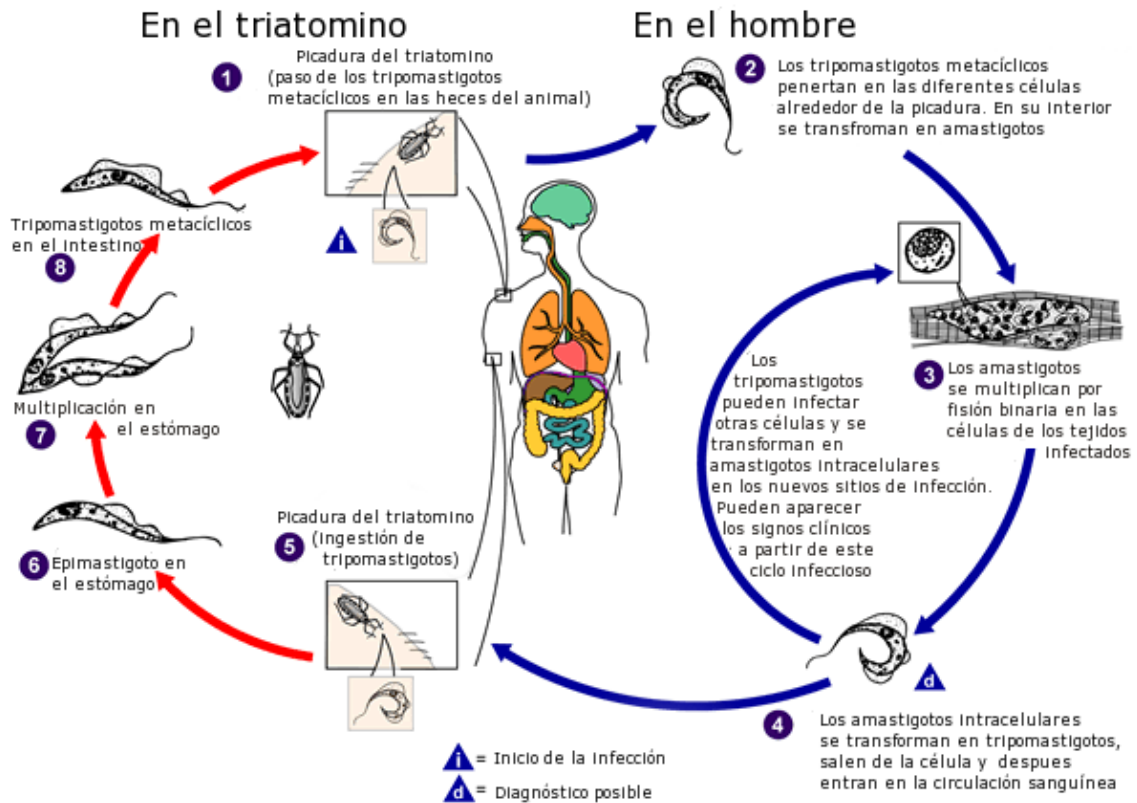


Figura 2.- Ciclo de vida del *T. cruzi*.

Obtenido de Centros para el control y la prevención de enfermedades. Atlanta, USA.

(Fecha de consulta 22/09/2010).

Puede existir una interacción entre los dos ciclos (doméstico y silvestre) (Figura 2), que se produce ya sea por el ingreso del hombre y/o animales domésticos al ámbito silvestre donde pueden ser infectados por *M. spinolai*, o la entrada de mamíferos silvestres al ambiente doméstico donde podrían ser infectados por *T. infestans* (Schenone *et al.*, 1991).

La infección de mamíferos por *T. cruzi* se ha descrito en alrededor de 150 especies en América Latina, siendo los más importantes reservorios el perro *Canis familiaris* Linnaeus, 1758 y el gato *Felis catus* Linnaeus, 1798 entre los domésticos y *Chinchilla lanigera* Molina, 1782; *Octodon degus* Molina, 1782; *Abrocoma bennetti* Waterhouse, 1837, y *Phyllotis darwini* Waterhouse, 1873, entre los silvestres descritos para Chile (Canals *et al.*, 1998).

En todos los casos, vale destacar que la determinación de una especie como reservorio del *T. cruzi* depende de:

- Determinación de la distribución geográfica del hospedador coincidente con la del parásito.
- Asociación de esa distribución a particularidades de sus respectivos biomas.
- Determinación de su prevalencia de infección entre subpoblaciones demográficas (por ejemplo, jóvenes y adultos).
- Establecimiento de escalas temporales y espaciales para que el fenómeno conocido en una determinada área no pase a otras áreas no estudiadas (Rodrigues y Correa, 2009).

La importancia de los roedores como reservorios silvestres está dada por:

- Son frecuentemente hospedadores de varios parásitos de carácter zoonótico.
- Abarcan el grupo de mamíferos con mayor biomasa en cualquier ecotopo silvestre.
- Son los principales blancos de predación naturales, posibilitando una vía alternativa de dispersión de varias especies de microorganismos.
- Aunque sean silvestres, muchas especies frecuentemente se aproximan a las habitaciones humanas, favoreciendo la formación de un gradiente continuo de transmisión de microorganismos entre los ambientes silvestre y doméstico. (Rodrigues y Correa, 2009).

Estudios realizados en nuestro país entre 1985 y 1995, mostraron que la prevalencia y distribución de la enfermedad de Chagas se redujo a consecuencia del éxito de las actividades antivectoriales, declarándose en 1999 la interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi* (OMS, 2002).

La principal forma de control para la transmisión por vectores es realizada con productos químicos aplicados directamente en las casas y anexos, para combatir a los insectos. Otra forma de control, socialmente más adecuada, son los programas de mejoramiento de casas rurales que los insectos vectores no puedan colonizar. Estas medidas asociadas, control de insectos y mejoras habitacionales, son señaladas como las más eficaces desde la década de 1980 (Días, 1987).

4) El parásito

Su agente etiológico, es el parásito protozoario *T. cruzi*, este es un protozoo flagelado altamente variable. Morfológicamente presenta cuatro formas: amastigote (intracelular), epimastigote, tripomastigote y tripomastigote metacíclico (Brener, 1973).

Trypanosoma cruzi puede infectar un gran número de vertebrados, a excepción de aves y anfibios (Brener, 1973).

La transmisión natural y más frecuente se lleva a cabo por un mecanismo de contaminación por heces de triatomíneos infectados con *T. cruzi*. En la fase infectante, el tripomastigote metacíclico, penetra al vertebrado a través de piel escoriada, mucosas sanas, e incluso piel indemne (Velasco, 1991). Pero también puede ser adquirido *in útero* (vía transplacentaria), transfusión sanguínea, al criar animales silvestres y domésticos o al consumir productos cárnicos semicrudos, por falta de cuidados en el trabajo de laboratorio y por el trasplante de órganos (Pinto, 1990).

Morfológicamente *T. cruzi* posee un organelo similar a las mitocondrias de las células de los mamíferos, llamados kinetoplasto, el que posee una red enrollada de ADN, el ADNk, que constituye el 20-25% del total de ADN del parásito. Por microscopía electrónica se ha evidenciado que estas moléculas de ADNk están organizadas en maxicírculos y minicírculos; cada kinetoplasto posee entre 20.000 a 25.000 minicírculos con alrededor de 1.400 pares de bases cada uno y 20 a 25 moléculas de maxicírculos (Shapiro y Englund, 1995)

4.1) Clones del parásito

Este protozoo se multiplica asexualmente, generando así una estructura poblacional de tipo clonal, lo que implica entidades independientes, los que pueden diferenciarse por sus propiedades biológicas (Tibayrenc, 1995).

Tibayrenc (1995 y 1996) y Souto *et al.* (1996) describieron que *T. cruzi* se encontraba dividido en dos grandes líneas genéticas (linaje 1 y linaje 2), las cuales fueron descritas como DTUs (Tibayrenc, 1998 a-c) y que el segundo linaje (DTU 2), se encuentra dividido en 5 subgrupos (2 a-e) (Brisse *et al.*, 1998).

Barnabé (1999), apoya la descripción de estos dos grandes linajes para los clones de *T. cruzi*, describiendo que: TcI (DTU 1) el más numeroso en áreas endémicas y se observa con mayor frecuencia en los ciclos silvestres, y el linaje TcII (DTU 2) predomina en seres humanos.

García (2001), apoya esta teoría comentando que TcI principalmente es de origen selvático y circula entre animales y triatomíneos silvestres, en tanto que TcII se asocia con el ciclo domiciliario, manteniéndose entre insectos, animales domésticos y humanos.

La heterogeneidad biológica ha sido observada a nivel de cepas o aislamientos y algunos trabajos han abierto la posibilidad de considerar un comportamiento diferenciado entre los clones constitutivos con respecto a su cepa parenteral (Apt y Reyes, 1990).

Se ha propuesto que la diversidad molecular existente en cepas de *T. cruzi* puede afectar el funcionamiento de los tejidos y órganos que infectan, como se evidencia en el hecho de que infecciones con cepas de parásitos pertenecientes a diferentes grupos fenotípicos, inducen distintos patrones histopatológicos en ratones infectados (Andrade, 1999., De Luca *et al.*, 1993).

Es así como estudios desarrollados con cepas de laboratorio sugieren que la expresión variable de la enfermedad de Chagas puede ser influenciada por la genética y la diversidad biológica de clones de *T. cruzi* circulantes en reservorios selváticos y domésticos (Macelo y Pena 1998, Magalhaes *et al.*, 1996).

Se ha visto que existe una predilección por ciertos tejidos de acuerdo al clon que se trate; esta diferencia genómica se expresa en las distintas manifestaciones de la enfermedad, pudiendo cursar desde signología inexistente hasta una afección sobreaguda, pasando por daños a nivel cardíaco y digestivo en el ser humano. Estudios revelan que la forma digestiva de la enfermedad de Chagas predomina en Chile y la zona central de Brasil, esta observación sugiere que la genética del hospedero y del parásito son factores que pueden ser de importancia para dilucidar la fisiopatología de la enfermedad (Angel *et al.*, 2007).

Apt y Reyes (1990), investigaron las características biológicas de los distintos clones del parásito, como: la virulencia, la evolución de la parasitemia, el histotropismo y las formas celulares predominantes. En este estudio fue posible diferenciar hasta tres grandes grupos de cepas de *T. cruzi* denominados biodemas. Como resultado final se apoyó la teoría actual donde se diferencian dos grandes linajes de *T. cruzi*. TcI (DTU1) que se relaciona con ciclo silvestre y en casos de humanos del Altiplano Chileno-Boliviano y de algunos casos de Venezuela. En tanto que TcII (DTU2) se encontró más asociado al ciclo doméstico.

Según, Westenberger *et al.*, (2005); los genotipos TcIIa y TcIIc pueden tener su origen en genotipos TcI y TcIIb como resultado de la fusión genética. Una segunda fusión genética entre los genotipos TcIIb y TcIIc, pudieron haber formado los genotipos TcIIId y TcIIe. Así como TcI y TcIIb parecen ser los linajes menos complejos, por lo tanto más primitivos.

Recientemente se han detectado *T. infestans* capturados desde casas positivas con el clon silvestre (DTU1) y también pacientes con dicho clon. Este clon se asocia a una presentación más aguda y virulenta en humanos (Coronado *et al.*, 2006).

Podemos considerar la hipótesis de una selección natural de clones por parte del hospedador de cada ciclo, y que esto mantenga sus tasas de prevalencia en determinado ciclo, ya que se ha comprobado la existencia de un efectivo control y posterior eliminación de la infección con diferentes clones de *T. cruzi* por el sistema inmune de diferentes mamíferos, lo que fue experimentalmente probado por Jansen *et al.*, (1999).

En un estudio en donde se analizó por primera vez la distribución de los diferentes clones de *T. cruzi* en seres humanos como en *T. infestans* alimentados con la misma sangre periférica de los individuos humanos, se encontró que la frecuencia de cada clon era distinta según fura humano o *T. infestans*. Se concluyó a raíz de esta investigación que un genotipo que no prolifera en los hospederos invertebrados, tiene la posibilidad de proliferación en los vertebrados, posterior a la infección, lo que mantendría en la naturaleza la constante diversidad de clones de *T. cruzi* (Coronado *et al.*, 2006).

5) Vectores

En América se han descrito al menos 126 especies de triatominos, todos ellos potencialmente infectantes y por lo tanto vectores del *T. cruzi*. La mayoría de estas especies son silvestres, pero algunas han invadido y colonizado hábitats domésticos y peri-domésticos, siendo estos últimos calificados como las especies de mayor importancia epidemiológica (Schofield, 1994).

Se ha analizado e identificado que en la mayoría de los artrópodos en donde se ha logrado la infección experimental con *T. cruzi* el ciclo del parásito no se continúa hasta tripomastigote metacíclico (estadio infectante), como ocurre en los hospederos naturales, salvo *Cimex lectularius*, *Ornithodoros moubata* (Brumpt E, 1912); *Melophagus ovinus* (Rodhain J, 1985) y *Ornithonyssus bacoti* (Cortés-Jiménez, 1994), pero no está comprobada la transmisión del parásito por parte de ellos.

El impacto de la transmisión vectorial en Chile se manifiesta a través de una elevada proporción de insectos infectados por *T. cruzi*. Se estima un promedio nacional de infección de *T. infestans* de 32,5%, mientras que *M. spinolai* presenta un promedio de infección de un 11,4%, a través del método de examen directo al microscopio (Canals *et*

al., 1998); este valor de referencia aumentaría en un 16% por el método diagnóstico de la PCR (Muñoz, 2001).

Alimentación de Triatominos

La mayor parte de los triatominos domésticos se alimentan de noche cuando sus hospederos vertebrados están durmiendo. Los triatominos son insectos generalmente eurifágicos, salvo algunas excepciones (*C. pilosa*, *Psammolestes* spp). Pruebas en laboratorio de tres especies de triatominos domésticos (*T. infestans*, *T. dimidiata* y *R. prolixus*), han demostrado preferencia alimentaria por animales homeotermos y en reposo. Especies menos específicas de hospedero pueden alimentarse no solo de mamíferos, sino también de aves y reptiles (Zeledón, 1983).

La irritabilidad del hospedero a la picada es un factor que influye tanto en la alimentación de los triatominos como en sus parámetros poblacionales. Generalmente, existe una reacción inflamatoria local generada por la saliva del insecto, prurito y en algunos casos anafilaxis y necrosis de la piel, sin embargo, la introducción del estilete es generalmente indolora. Las especies silvestres como *T. protacta* y *T. rubrofasciata*, provocan reacciones más intensas a diferencia de las especies domésticas como *T. infestans* (Acuña, 2001).

Un creciente número de vinchucas alimentándose de un animal provocarán una creciente irritabilidad de éste, lo que disminuirá su tamaño poblacional, debido a que un estado nutricional deficiente de los insectos se traduce en una menor velocidad de desarrollo ninfal, una menor postura de huevos y una mayor posibilidad de dispersión de los adultos (Acuña, 2001).

Este mecanismo de regulación del tamaño poblacional, es el más relevante en las especies domésticas; en tanto que las especies silvestres factores como la destrucción del hábitat o la migración de sus hospederos son claves en la dispersión de sus individuos y por ende de la dinámica poblacional. Otros factores reguladores del tamaño poblacional y de actividad en las vinchucas son la temperatura y la humedad ambiental existiendo rangos óptimos de éstos dependiendo de la especie de vinchuca mientras que los depredadores y el parasitismo serían poco relevante (Zeledón, 1983).

Los triatomíneos, a diferencia de otros insectos hematófagos, como los mosquitos, se caracterizan por tener una estrategia demográfica de tipo K, esto es, especies “nidíferas” que se han adaptado a un ambiente que les ofrece una fuente de alimentación más estable, con periodos de vida más largos, desarrollo más lento y mayor talla final (Schofield, 1994).

La dispersión de los triatomíneos es clave en la propagación de la enfermedad de Chagas, porque interfiere en los planes de control químico de las poblaciones de vectores domésticos al producirse recolonización de casas ya tratadas. En este aspecto son claves las especies vectoras secundarias como *M.spinolai* que pueden colonizar viviendas rurales al ser alterado su hábitat silvestre original (Schofield, 1994).

El contacto de la vinchuca con el hospedero es mediado por la detección de una combinación de señales propias del hospedero, como son la vibración, textura de superficie del cuerpo del hospedero, tipo de piel, grosor de la cubierta de pelo y químicos como: nivel de dióxido de carbono en la respiración, olores, estímulos visuales, calor y humedad relativa (Acuña, 2001).

Para la orientación en los insectos a cortas distancias, sería relevante el CO₂ y el calor emitido por el hospedero. Para la orientación a mayores distancias serían relevantes algunas claves olfativas y visuales. En el estilete de los insectos existen quimiorreceptores de contacto, los que serían importantes en el reconocimiento final del hospedero, así también, factores de la sangre (ej. Nucleótidos como ATP) lo serían para la decisión de alimentarse (Zeledón, 1983; Schofield, 1994).

Algunos factores que afectan la alimentación de los triatomíneos, son según Friend y Smith, (1977):

- Gradientes de temperatura, dióxido de carbono, olores y estímulos visuales, que determinarían la rapidez con que comiencen a probar un probable hospedero.
- Composición de la dieta (nucleótidos fagoestimulantes), presiones osmóticas, pH, tipo y concentración de iones, que determinarían si ocurrirá o no el evento de alimentación.

- Periodo de tiempo desde la última alimentación y grado de estiramiento abdominal.

La variedad de hospederos incluídos en la dieta de los triatominos depende de ciertas variables identificadas por Canals *et al.*, (2000):

- La habilidad de los mismos para alcanzar a su fuente de alimento.
- La estación del año.
- Los ecosistemas, o hábitos de la especie; 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.

En diversos estudios de preferencia alimentaria de las vinchucas, se observa la incorporación de 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 (Canals *et al.*, 1998).

No se han encontrado diferencias respecto a sus hábitos alimentarios en insectos infectados con *T. cruzi*. 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 sus víctimas y a la abundancia relativa y no a cambios conductuales vinculados a la infección de los insectos (Canals *et al.*, 2001).

5.1) *Triatoma infestans*:

La dieta de *T. infestans* incluye sangre de diversos animales endotérmicos, tales como gatos, perros, liebres y roedores, pero la fuente preferida es la de humanos. Excepcionalmente las aves y los anfibios han sido encontrados formando parte de su alimentación (Canals *et al.*, 2000).

En un análisis temporal sobre la cantidad de hospedadores, se encuentra inicialmente el trabajo de Knierim *et al.*, (1976), quienes revisaron la alimentación de 87 ejemplares

de *T. infestans* obteniendo un 77% con 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 35,75%.

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

5.2) *Mepraia spinolai*

Mepraia spinolai presenta un espectro más amplio de hospederos en sus hábitos dietarios incluyendo: conejo, perro, cabra, gato, roedores silvestres, humanos, aves y reptiles (Canals *et al.*, 2000).

Existe un estudio entre los años 1985 y 2001 que muestran como primera preferencia al conejo, con porcentajes de inclusión que van desde un 50% a un 76,8% (Canals *et al.*, 1998; Rengifo, 2000 y Canals *et al.*, 2001).

Mepraia spinolai se encuentra asociada a lugares donde habitan zorros, roedores silvestres, conejos, cabras y también marsupiales como *Thylamis elegans* Waterhouse, 1939, especies de las cuales se alimentaría. Se han señalado lagartijas, culebras y aves como otras fuentes de alimentación (Acuña, 2001).

En un estudio que comparó algunos parámetros conductuales y fisiológicos de alimentación entre *T. infestans* y *M. spinolai*, se observó que esta última tendría una menor distancia crítica para la percepción del calor, pues no disminuyó sus movimientos antenales al acercarse a una fuente de temperatura; a diferencia de *T. infestans*, presentando ambas todas las conductas típicas descritas para la orientación hacia una fuente térmica, esas son: movimiento de las antenas, actividad locomotora y extensión de la proboscis. Además, se vio que ambos insectos consumen similares volúmenes de sangre, siendo el insecto silvestre más agresivo al alimentarse (picada más rápida y menor tiempo de alimentación), demorándose eso si mayor tiempo en

defecar, por lo que se concluyó que *M. spinolai* sería menos eficiente en transmitir *T. cruzi* (Canals *et al.*, 1998).

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) Otra excepción lo fue un análisis de ejemplares de la Isla Pan de Azúcar, Región de Coquimbo, en donde se 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 triatomos con mamíferos marinos (Sagua *et al.*, 2000).

6) Hospederos

Trypanosoma cruzi, posee dos tipos de hospedadores: el hospedador intermediario que es un mamífero incluido el hombre, y los hospederos vectores que son insectos hemípteros que se alimentan de sangre (hematófagos) y pertenecen a la familia Reduviidae, más específicamente la subfamilia triatominae. En estos hospedadores el protozooario asume diferentes formas morfológicas (Brenner, 1973).

El humano, el perro y la zarigüeya u oposum, son los reservorios más importantes para *T. cruzi*, en sus respectivos ciclos. El humano es considerado el reservorio de mayor importancia, ya que tiene una amplia expectativa de vida (OMS, 2002).

Existen 180 especies mamíferas con características domésticas, sinantrópicas y silvestres susceptibles de ser infestadas por *T. cruzi*, especialmente roedores constructores de nidos y oposum, estos animales presentan una distribución en América que va desde el sur de EE.UU, hasta la Patagonia (40° N hasta 45° S) (OMS, 2002).

En la mantención del ciclo silvestre de *T. cruzi* son importantes contribuyentes los roedores, entre los cuales se han registrado infectados a más de 50 especies. La importancia de esos animales como reservorio del parásito está dada por su elevada abundancia relativa entre los pequeños mamíferos, en especial en las áreas en las cuales su tasa de infección es más elevada (Dobson, 2004).

6.1) Reservorios y prevalencia de *T. cruzi*

6.1.1) Roedores

Dentro de los roedores debemos reconocer a los originarios de América y a los introducidos, ya que este es un importante antecedente evolutivo a la hora de analizar la prevalencia de infestación por el parásito y el tipo de clon circulante según especie de roedor reservorios.

La familia muridae del orden rodentia comprende 281 géneros y 1326 especies, agrupando esta familia a casi un tercio de las especies de mamíferos del mundo (Musser y Carleton, 1993).

De la mencionada familia, la subfamilia más numerosa es la murinae, con 122 géneros y 529 especies, a este subgrupo pertenecen las conocidas tres especies de roedores comensales que han llegado a ser cosmopolitas, cuya llegada a América se produjo junto con la llegada de los conquistadores españoles hace 500 años aproximadamente, estas son: La laucha (*Mus musculus*), la rata negra (*Rattus rattus*), la rata de noruega (*Rattus norvegicus*) (Spotorno y Walker, 2000).

La fauna local de América del Sur siempre estuvo formada por xenarthras (endémicos) y marsupiales. Después de la llegada de los roedores estos se adaptaron bien y se diversificaron en un número considerable de especies, de distribución restringida al continente sudamericano. Ellos colonizaron los más diversos tipos de hábitat desde las florestas tropicales a los desiertos, de las planicies de elevadas altitudes a las planicies inundadas, del ambiente silvestre al ambiente urbano, más allá de los más diversificados estratos naturales, encontrando desde especies fosoriales a especies de hábitos semiacuáticos y arborícolas.

Esto hizo posible la existencia de una comunidad rica de roedores en cada región, permitiendo, la coexistencia de especies congéneres. Hoy en día esta asombrosa adaptación se expresada en una alta diversidad (Flynn y Wyss., 1998).

Considerando la diversidad específica y genérica, en segundo lugar se encuentra la subfamilia sigmodontinae con 79 géneros y 423 especies. Para las Américas este resulta ser el grupo más importante de roedores (Musser y Carleton, 1993). En Sudamérica actualmente son muy números existiendo alrededor de 40 géneros y 200 especies, de los cuales 19 géneros y 37 especies están presentes en Chile (Spotorno y Walker, 2000). A *olivaceus*, *O. longicaudatus*, *Phyllotis darwini* son los sigmodontinos más abundantes de Chile (Mann, 1978).

Se ha sugerido que existiría un proceso coevolutivo entre *T. cruzi* y los vertebrados reservorios de la enfermedad, que habría llevado a que exista una menor virulencia de los genotipos del protozoo asociados a micromamíferos de antigua data en América. En este contexto, cobra relevancia el conejo europeo por su alta participación en la dieta de la vinchuca silvestre, por su reciente llegada a América y por su crianza por parte de las comunidades rurales, lo que podría favorecer el acercamiento de *M. spinolai* y la introducción de genotipos de mayor patogenicidad a la población humana (Schofield, 2000).

Prevalencia de *T. cruzi* en los Roedores

Las primeras investigaciones sobre la infección en roedores silvestres por el *T. cruzi* era poco documentada y en la mayoría de los casos se restringía a investigaciones sobre animales que frecuentan áreas domiciliarias, en las cuales se concentraban los esfuerzos de captura. Un ejemplo de eso es que, al hacer una búsqueda entre los pequeños roedores infectados, encontraremos muchas descripciones de *R. rattus*, debido a sus hábitos de distribución próximo a áreas de influencia humana (Mills y Childs 1998).

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

cifras fueron obtenidas en zonas urbanas y silvestres respectivamente dentro de Chile (Apt y Reyes 1990; Rozas *et al.*, 2005).

En Venezuela, por ejemplo se han encontrado altos índices de infección es puercoespín arborícola, y también en la rata arrocera (40 y 100%, respectivamente) (OMS, 2002).

En Ecuador, *R. rattus* fueron encontrados tanto con una alta prevalencia de infección (el 18 %), como con alta abundancia relativa de esa especie. La importancia de esos roedores en la epidemiología local de la enfermedad fue relacionada a la alta densidad poblacional de los roedores y su distribución coincidente a la de los humanos (Pinto *et al.*, 2006).

En varios estudios realizados en Brasil, Ecuador y Venezuela, la especie *M. musculus* raramente fue encontrada naturalmente infectada por *T. cruzi* (Xavier *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2006; Herrera y Urdaneta-Morales, 1997).

El roedor *Sigmodon* sp., es un ejemplo de roedor con baja o ninguna infección por *T. cruzi* en los estudios realizados en Estados Unidos, Costa Rica, Brasil y Venezuela (Eads y Hightower, 1952., Xavier *et al.*, 2007., Herrera y Urdaneta-Morales, 1997).

Roedores del género *Proechimys*, descritos como importantes mantenedores del ciclo de transmisión de diferentes especies de *Leishmania*, también presentan pocos relatos de infección por *T. cruzi*, en prevalencias que no llegan al 2 % en Brasil y Colombia (Xavier *et al.*, 2007; Mills y Childs, 1998).

En el año 1990, se definieron para Chile los mamíferos reservorios, de *T. cruzi* más importantes, Entre los pertenecientes al ciclo silvestre estaban *C. lanígera* (29,4%), *O. degus* (5,3%), *A. bennetti* (7,4%), *C. griseus* (3,85), y *P. darwini* (2,5%). Entre los domésticos el gato 6,1% y perro 3,2% (Apt y Reyes, 1990). Datos más recientes obtenido mediante técnicas diagnósticas más sensibles, como la PCR, mostraron un promedio de 43,3% de positividad, porcentaje que sube a 51% al complementar con el análisis de Southern. Este estudio es el que ha registrado las mayores cifras de prevalencia en animales silvestres y sinantrópicos. El detalle por especies y prueba respectivamente fue el siguiente: *capra hircus* 26% y 36 %, *A. olivaceus*, 45,5 y 59,1%,

O. degus 42% y 51%, *T. elegans* 46% y 46%, *P. darwini* 41% y 45% (Rozas *et al.*, 2005).

En Brasil datos del Laboratorio de Biología de Tripanosomátidos también muestran importantes tasas de infección de otras especies roedoras, *Thrichomys pachyurus* en el Pantanal del estado de Mato Grosso do Sul y *Thrichomys apereoides*, en el centro oeste del país. Se destaca que la infección de esos animales ocurre tanto por *T. cruzi* I, como por *T. cruzi* II, de acuerdo con la localidad estudiada (Rodrigues y Correa, 2009).

En Perú, los principales reservorios son roedores y en menor proporción son mamíferos como perros, gatos, cerdos, conejos y vacunos (Vargas, 2005). Otro estudio realizado en este país, se estableció como principal fuente de alimento de *T. infestans*, a aves, roedores, humanos y perros (Solís *et al.*, 2003).

En Perú y Bolivia, donde los cuyes (*Cavia porcellus*) son criados en el hábitat peridomiciliario, para servir de alimento al hombre, los índices de infección en estudios publicados para el año 1978 llegaron a 61,1 %; en comparación a los ratones que llegaron a un 30 % (Maekelt, 1983).

En la provincia de Panamá se demostró mediante análisis histológicos, la infección por *T. cruzi* en 57 de 100 ratas. Esto demuestra su importancia como reservorio domiciliario de *T. cruzi* para ese país (Calderón – 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 a *T. cruzi*. (Reyes *et al.*, 2002).

6.1.2) Marsupiales

Podemos considerar como variables importantes para el sostenimiento del parásito en este grupo de animales los siguientes aspectos:

- Se encuentran en un nivel intermedio de la cadena trófica, por lo que su relación con otras especies animales depende notablemente de este hecho. Los grandes carnívoros y las rapaces nocturnas se encuentran entre sus predadores principales.
- En otro tiempo fueron cazados para el aprovechamiento de sus pieles, hoy devaluadas. En la actualidad la caza tiene como objetivo, en muchas de las áreas en las que se distribuyen, el aprovechamiento de su carne, de aspecto y sabor parecidos al pollo.
- Algunas especies no descartan acercarse a zonas pobladas, especialmente explotaciones agrícolas, siendo perseguidas por los destrozos que ocasionan en las plantaciones (Feldhamer, 2003).

La Zarigüeya (marsupiales del género *Didelphis*) desde Carlos Chagas, son señalados como los más importantes reservorios del *T. cruzi* por las siguientes características:

- Altas prevalencias de la infección natural por *T. cruzi* en estos animales, relatada por diversos autores.
- Su capacidad de mantener, en las glándulas odoríferas, el ciclo de multiplicación extracelular del parásito.
- Su comportamiento nómada.
- Su capacidad de colonizar domicilio y peridomicilio en áreas forestales muy devastadas.

Estas características muestran que estos animales deben ser blancos de vigilancia epidemiológica porque pueden servir de marcadores para la presencia de *T. cruzi* en el área (Jansen-Franken, 2009). Es importante analizar esta información y compararla a nivel nacional sobre las especies de pequeños marsupiales existentes en nuestro territorio.

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 en el triatomino (Particularmente en *Triatoma guasayana* a veces menor al 1%) (Wisnivesky-Colli et al., 1992).

La Zarigüeya, ampliamente distribuida en el hemisferio oeste del continente Americano, es uno de los hospederos de *T. infestans* más frecuente en todos los países donde se ha estudiado (Schweigmann *et al.*, 1995). Se encuentra en árboles y arbustos, habitando lugares cercanos a las viviendas humanas, probablemente es el reservorio silvestre más importante, porque es omnívoro, muy prolífico, con un alto poder de adaptación y altos índices de infección por *T. cruzi*, desde 20% hasta un 100%, sin presentar evidencia de enfermedad (Urdaneta-Morales y Nironi, 1996; Ravinovich *et al.*, 2001).

Son de importancia epidemiológica los marsupiales de los géneros *Lutreolina* y *Didelphis*, debido a que son capaces de mantener simultáneamente los dos ciclos de multiplicación del *T. cruzi*, tanto en condiciones naturales como experimentales. De hecho, en las glándulas odoríferas, el parásito se puede multiplicar en la forma epimastigote y diferenciarse a tripomastigote metacíclico simultáneamente al ciclo multiplicativo intracelular en los diversos tejidos del animal. Eso significa que la zarigüeya puede, al mismo tiempo, ser reservorio y vector del *T. cruzi* (Deane *et al.*, 1986).

Aunque diversos autores hayan relatado la presencia de *T. cruzi* en las glándulas odoríferas de *Didelphis* naturalmente infectados, no se conoce su capacidad vectorial ni la importancia de este parasitismo en el mantenimiento del *T. cruzi* en la naturaleza. Las glándulas odoríferas de *Didelphis* (n=2) se encuentran bajo la piel, revestidas por una capa de grasa, próximas al segmento terminal del intestino grueso. Un delicado canal lleva el contenido hasta el borde del ano. Macroscópicamente las glándulas odoríferas presentan una superficie externa de aspecto nacarado y tienen una capacidad de contener aproximadamente 500 µl. Una robusta capa de músculo estriado recubre dos tercios de cada glándula (Deane *et al.*, 1986).

Es interesante mencionar que el parásito se distribuye en la luz de las glándulas odoríferas en un patrón peculiar, siendo las formas epimastigotes más abundantes en las proximidades del epitelio glandular y las formas metacíclicas se ubican en el centro. El material inmediatamente yuxtapuesto al epitelio glandular, donde predominan los epimastigotes, fue caracterizado teniendo como componente mayoritario al ácido hialurónico. El resto del contenido está formado básicamente por lípidos. La localización tan peculiar de los parásitos en las glándulas resulta probablemente en la

eliminación preferencial de las formas infectantes del parásito cuando el hospedador, como respuesta a un estímulo negativo, elimina el contenido de las glándulas que presenta un fuerte y desagradable olor. Adicionalmente, se observó que las formas metacíclicas derivadas de epimastigotes de las glándulas odoríferas presentan, como mínimo, la misma competencia infectiva de las formas metacíclicas de cultivo axénico o tracto intestinal de triatominos (Carreira *et al.*, 1996).

Aunque la mayoría de los aislados *T. cruzi* derivados de marsupiales han sido caracterizados como pertenecientes al genotipo TCI, el genotipo TCII también ha sido aislado de estos animales, un estudio sobre infección natural de *Didelphis aurita* y *P. frenata* por *T. cruzi* en un fragmento de la región mata atlántica mostró el 50% de hemocultivos positivos en estas dos especies de didélfidos que viven en simpatria. Las caracterizaciones bioquímica y molecular de los aislados del parásito mostraron que ambas especies eran parasitadas tanto por TCI como por TCII y que estas dos especies, aún viviendo en simpatria, podrían participar de ciclos independientes de transmisión del parásito (Jansen *et al.*, 2000).

Los marsupiales didélfidos incluyen importantes reservorios del *T. cruzi* y merecen una especial atención durante los estudios de evaluación de riesgo o de brotes de la enfermedad de Chagas. Entretanto, siempre debemos recordar que el papel que este grupo de mamíferos representa en las diferentes cadenas de transmisión de *T. cruzi* en la naturaleza varía de acuerdo al escenario ecológico temporal y local. Por lo tanto, conclusiones equivocadas emergerán de estudios en el campo que no contemplan la complejidad del ciclo de transmisión de un parásito tan heterogéneo y ecléctico como el *T. cruzi* (Jansen *et al.*, 2000).

6.2) Tripanosomiasis en reservorios silvestres

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas, *T. cruzi*, circula entre especies micromamíferas reservorias sin causarles daño, existiendo un equilibrio ecosistémico, pero eventos de selección poblacional en los elementos de la transmisión podrían cambiar esta condición (Briones *et al.*, 1999).

Las formas tripomastigotes metacíclicas son altamente infectantes, pudiendo invadir los primeros tipos celulares que encuentran, que pueden ser, entre otros, macrófagos, fibroblastos o células epiteliales. Al invadir estas células ocurre la proliferación intracelular y la liberación de formas tripomastigotes, así como algunas formas intermediarias y amastigotes (estas últimas en menor proporción) en el espacio intercelular. Estas formas pueden invadir nuevas células localizadas en la localidad de la infección, pero también pueden alcanzar la corriente circulatoria y llegar a todos los tejidos del hospedador, invadiendo los más diferentes tipos celulares (De Souza, 2009).

La observación de formas tripomastigotes en la sangre de animales infectados mostró que no todas son idénticas entre sí, lo que indica la existencia de dimorfismo, o incluso de polimorfismo, en *T. cruzi*, caracterizado por la presencia de formas tripomastigotes gruesas, finas e intermediarias, tal como descrito para los tripanosomas africanos. Las interpretaciones para este hecho han sido las más variadas, incluso como indicación de dimorfismo sexual (De Souza, 2009).

Podemos encontrar cepas que presentan un predominio de formas delgadas, como, por ejemplo, la cepa Y. Ya en otras, como la cepa CL, predominan las formas gruesas. Brener y colaboradores realizaron varios estudios para aclarar las posibles diferencias entre ambas formas. Por ejemplo, verificaron que, en algunas poblaciones, existía un predominio de las formas delgadas durante todo el curso de la infección experimental en ratones. En algunas cepas, a medida que la infección se prolongaba, las formas gruesas pasaban a ser predominantes. Un conjunto de observaciones llevó a este grupo a considerar que las formas delgadas desaparecen rápidamente de la circulación para cumplir un ciclo intracelular mientras que las formas gruesas permanecen en la circulación. Aparentemente estas formas serían menos infectantes y más adaptadas al desarrollo en el vector (De Souza, 2009).

Entre los reservorios silvestres y/o sinantrópicos más ampliamente distribuidos en América se menciona el marsupial *Didelphis*, como ya se anunció en el capítulo anterior, se ha estudiado la infección natural de estos mamíferos por el Tc I (*T. cruzi* I) que se manifiesta con una virulencia muy baja y parasitemia detectable sólo por el xenodiagnóstico, hemocultivo o PCR, sin sintomatología aparente (Herrera *et al.*, 1997).

El tropismo tisular en los reservorios silvestres, estudiados en su condición natural o mantenidos como modelo de laboratorio (*D. marsupialis*, *R. rattus* y el caviomorfo *Trichomys apereoides*) han sido bajo con relación al número de órganos invadidos y a la carga parasitaria, observándose una tendencia al cardiotropismo, tropismo a la musculatura esquelética, musculatura lisa intestinal y en algunos casos, parasitismo a células del páncreas (Herrera *et al.*, 2004).

El *Didelphis*, como modelo silvestre en las infecciones experimentales presenta escasa mortalidad, debido a que estos marsupiales controlan la parasitemia, permitiendo un rápido avance hasta las formas pleomórficas del parásito más competentes para la infección del próximo eslabón, el vector. En estas experiencias se ha comprobado el tránsito desde el ambiente sistémico hasta las glándulas odoríferas. El *Didelphis* experimentalmente infectado se ha revelado una infección reversible (sangre -glándulas anales- sangre) con nidos de amastigotes en el epitelio de la mucosa y de la musculatura estriada de la glándula, sin evidencia de inflamación (Herrera *et al.*, 2004).

Infecciones experimentales de caviomorfos (Degus y Chinchillas) con *T. cruzi* han revelado miotropismo con vacuolización, miocitólisis y linfomacroeosinofilia, con infecciones estables, de forma independiente al genotipo del parásito, pero sin sintomatología evidente (Herrera *et al.*, 2004).

7) Ecología

Los roedores ejercen una mayor importancia en el mantenimiento de los ciclos de transmisión, por servir de conexión entre los ambientes domésticos y silvestres. Entre estos, destacan los roedores de los géneros *Rattus* y *Thrichomys*, este último, sin ninguna duda, el más citado y empíricamente comprobado reservorio del parásito (Mills y Childs, 1998).

Los géneros *Rattus* y *Thrichomys* tienen un importante papel como reservorio, principalmente en áreas degradadas y de alta influencia humana. Se describe que en áreas en que existe pérdida de diversidad de pequeños mamíferos silvestres, incluyendo roedores, se acaban seleccionando especies altamente competentes en el mantenimiento de un determinado microorganismo, con tasas de infección tan elevadas cuanto mayor

sea la pérdida de diversidad, este es un fenómeno descrito como “efecto diluyente”. Por lo tanto el mantenimiento de la biodiversidad es uno de los más eficiente mecanismos de mantenimiento de la enzootia a niveles basales, previniendo de este modo la emergencia de casos humanos de la enfermedad (Xavier *et al.*, 2007).

La vigilancia epidemiológica para *T. cruzi* es compleja, puesto que se debe considerar todos los eslabones de la cadena de transmisión y el paisaje en el cual ocurren, la mayoría absoluta de las acciones y proyectos de vigilancia epidemiológica se basa en el levantamiento y colecta de triatominos en el domicilio y peridomicilio y en el monitoreo de nuevos casos de la enfermedad de Chagas en la población humana, sin embargo, debemos recordar que los triatominos vectores adquieren la infección por *T. cruzi* alimentándose sobre sus hospedadores y/o reservorios, que pueden incluir un número significativo de especies de mamíferos. También debemos recordar que el *T. cruzi* es un parásito ecléctico con relación a sus hospedadores y hábitat y que es transmitido en redes parasitarias bien establecidas en determinado bioma y que éste es un aspecto que debe ser llevado en cuenta en las acciones de vigilancia sanitaria (Jansen-Franken, 2009).

El ciclo de transmisión de *T. cruzi* en el ambiente silvestre aún es un rompecabezas no resuelto, ya que presenta peculiaridades regionales y temporales, macro y micro ecológicas, que interfieren en la interacción de este parásito con sus hospedadores y vectores. La complejidad de los ciclos de transmisión de este parásito resulta evidente en los recientes brotes de la enfermedad de Chagas que sucedieron en varias regiones de Brasil. Estos brotes ocurrieron de manera independiente de la domiciliación de triatominos y vienen siendo atribuidos (en algunos casos sin comprobación empírica) a la ingestión de alimentos contaminados con formas metacíclicas infectantes derivadas de insectos (Jansen-Franken, 2009).

Estos brotes, como también otras cuestiones aún no respondidas, entre las cuales podemos mencionar los diferentes cuadros de la enfermedad en diferentes regiones geográficas, muestran que cada situación epidemiológica de la tripanosomiasis americana es única en un determinado rango de espacio y tiempo, por lo tanto, las generalizaciones de las medidas de control corren el riesgo de ser ineficientes (Jansen-Franken, 2009).

La vigilancia epidemiológica debiese considerar en cada área en estudio, no solo la fauna de triatomíneos, sino que también la diversidad de la fauna de mamíferos de vida libre, sinantrópicos y domésticos. Al estudiar el patrón de infección de estas especies se determinara su competencia como reservorios. También se debiese analizar los patrones de la vegetación, clima; alteración del hábitat original y alteración del paisaje; factores que pudiesen afectar las dinámicas poblacionales. Se puede mencionar que alteraciones ambientales, naturales o no, generan dispersión de animales e insectos, estos consecuentemente trasladan sus parásitos a nuevas áreas, creando un nuevo escenario epidemiológico. Este es un fenómeno especialmente importante con parásitos generalistas como es el caso de *T. cruzi*. (Jansen-Franken, 2009).

El estudio de la transmisión de *T. cruzi* entre sus hospedadores y reservorios involucra la integración de diversas áreas del conocimiento. Solamente a partir de un abordaje multidisciplinar se podrá establecer una correlación entre la ecología del paisaje, el levantamiento faunístico, las tasas de prevalencia e incidencia y, finalmente, una evaluación de riesgo epidemiológico (Jansen-Franken, 2009).

8) Biogeografía del parásito

La hipótesis biogeográfica más común, acepta que las subpoblaciones TcI sean autóctonas de América del Sur y hayan evolucionado en conjunto con los marsupiales (*Didelphis*), mientras que las subpoblaciones TcII se separaron a partir de la coevolución lineal con roedores caviomorfos y primates primitivos. Recientemente, se ha sugerido que el TcII evolucionó en armadillos primitivos, ya que ellos eran abundantes en América hace 88 millones de años (Briones, *et al.*, 1999).

Dentro de este escenario biogeográfico también se propuso que las subpoblaciones de TcI son más homogéneas si las comparamos con las TcII, debido a su estrecha coevolución con un grupo de mamíferos ancestrales, los marsupiales. Mientras las subpoblaciones TcII son más heterogéneas por haber divergido y evolucionado en un número mayor de especies de mamíferos hospedadores (Yeo *et al.*, 2005).

Estudios sobre la dispersión de TcI y TcII entre sus hospedadores mamíferos en los biomas brasileños, mostraron que el TcI presenta una amplia distribución geográfica en comparación con la distribución focal de TcII. Aparentemente, el ciclo de transmisión del TcII es más restricto en la naturaleza. La restricta ocurrencia espacial del TcII aún continúa siendo un misterio. A pesar de la observación de diferentes especies de mamíferos infectados por el TcII, su frecuencia en la naturaleza es menor y visiblemente ocurre de forma circunscrita. Es posible que la falta de datos faunísticos en los estudios eco-epidemiológicos expliquen, en parte, la ausencia de los registros de mamíferos infectados por TcII (Varella y Xavier, 2009).

La mayoría de los estudios epidemiológicos realizados no consideran la distribución y la dinámica poblacional de mamíferos dentro de una determinada área de estudio; generalmente los estudios son puntuales y no reflejan la enzootia del *T. cruzi* como un sistema ecológico dinámico. Debemos considerar la facilidad de obtener registros de la infección en marsupiales y roedores, ya que estos, más allá de ser frecuentes en los ambientes rurales debido a su abundancia, también son frecuentes en los ambientes domésticos donde adquieren hábitos sinantrópicos. Obtener datos poblacionales de otras especies de mamíferos, como primates, quirópteros, xenarthras y carnívoros, son caros y logísticamente más difíciles, sin embargo, esos datos son extremadamente importantes para llevar a cabo estudios longitudinales en todas las áreas para conocer la actual biogeografía del *T. cruzi* (Varella y Xavier, 2009).

EL PROBLEMA

Cada día comprendemos que es necesario analizar desde una perspectiva ecológica las enfermedades zoonóticas, para de esta forma comprender la dinámica de transmisión.

Es por eso que debemos resolver la duda respecto a los clones que circulan en los reservorios silvestres (roedores y marsupiales) en Chile. Duda instaurada el año 2007, cuando Galuppo *et al.*, (2009) informó, los tipos y prevalencias de clones para 3 tipos de ratones, capturados en Calera de Tango como se muestra a continuación.

Cuadro 1.- Galuppo *et al.*, (2009), Resultado de infección por tipo de clon de *T. cruzi* en roedores capturadas en Calera de Tango.

Especie micromamífera	TcI	TcIIb	TcIIc	TcIIe	Indeterminado
<i>Rattus rattus</i>	9/10	1/10	2/10	1/10	0/10
<i>Phyllotis darwini</i>	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1
<i>Octodon degus</i>	1/8	3/8	5/8	0/8	2/8
Total	10/19	4/19	8/19	1/19	2/19

Para esta misma investigación se estableció diferencias significativas entre las especies *R. rattus* y *O. degus*, respecto a los clones prevalentes en ellos dentro del área Calera de Tango.

($\chi^2 = 8$; $df = 1$; $p < 0,01$).

Rozas *et al.*, (2007) publicó la situación para las especies reservarias de La Reserva Nacional Las Chinchillas.

Cuadro 2.- Rozas *et al.*, (2007), Resultado de infección por tipo de clon de *T. cruzi* en micromamíferos capturadas en Reserva Nacional Las Chinchillas.

Espece micromamífera	TcI	TcIIb	TcIIc	TcIIe	Indeterminado
<i>Phyllotis darwini</i>	13/31	14/31	7/31	8/31	2/31
<i>Abrothrix olivaceus</i>	9/31	11/31	7/31	7/31	3/31
<i>Octodon degus</i>	12/28	12/28	9/28	4/28	4/28
<i>Thylamys elegans</i>	2/6	2/6	2/6	1/6	1/6
Total	36/96	39/96	25/96	20/96	10/96

* En este estudio se indicó que para el caso de La Reserva Nacional Las Chinchillas no existe una asociación entre tipo de clon y especie de micromamífera silvestre hospedador.

Como podemos observar en los cuadros anteriores, podemos apreciar que en la primera publicación se establece una asociación para especie y tipo de clon prevalente en ella (Galuppo *et al.*, 2009), situación que no se comprueba en la segunda investigación (Rozas *et al.*, 2007); por ende es de interés para el trabajo de esta memoria aportar conocimiento en esta línea investigativa.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la prevalencia de genotipos (clones) de *T. cruzi* en micromamíferos, modulada por la presencia de dos vectores, en sectores endémicos de Chile.

Objetivos Específicos

- Establecer si existe asociación entre la presencia de especies vectores en la zona y la composición clonal de *T. cruzi* de los micromamíferos infectados de ese sector.
- Determinar la existencia de especificidad clonal para las distintas especies silvestres reservorios del parásito.
- Evaluar la posible existencia de asociación respecto a la prevalencia del parásito en las especies micromamíferas reservorias, respecto al vector o los vectores presentes en cada zona.
- Evaluar la posible existencia de asociación entre las especies reservorias y la presencia del parásito en ellas, independiente del tipo de vector o vectores, presentes para cada área en estudio.
- Reporte de la distribución y abundancia relativa de especies por sector, en un tiempo determinado

MATERIAL Y METODO

Áreas de estudio

Se trabajó con tres sectores silvestres, dentro la zona endémica para la enfermedad de Chagas, en búsqueda de micromamíferos, asociados a la presencia de vectores. Según tipo de vector se clasificaron de la siguiente manera:

ÁREA 1: Calera de Tango (Región Metropolitana, 33° 37' S, 70° 47'O) (1 ha de área aprox.).

[Presencia de *T. infestans*. (Bacigalupo *et al*, 2006)].

ÁREA 2: Putaendo (Región de Valparaíso, 32° 36'S, 70° 41'O) (1 ha de área aprox.).

[Presencia de *M. spinolai*].

ÁREA 3: Reserva Nacional Las Chinchillas, (Aucó Región de Coquimbo, 30° 30' S, 71° 06' W). (1 ha de área aprox.).

[Presencia de *T. infestans* + *M. spinolai*].

Captura

Se capturó un número de 35 micromamíferos por zona con trampas de captura (Sherman) cebadas con avena pelada machacada. (Se calculo este tamaño muestral con un p menor de 0,06 y se espera detectar una diferencia de 0,35, con un error alfa de 0,05 y una potencia de 80%).

Obtención de la muestra

Los animales capturados fueron transportados en las trampas al laboratorio de campaña o al Laboratorio de Ecología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de La

Universidad de Chile, donde se identificó al animal, mediante una clave, luego se anestesió con un producto inhalatoria y se obtuvieron 0,5 ml de sangre por punción intracardiaca. La sangre obtenida fue mezclada con 0,5 ml de anticoagulante y preservante (Guanidina-HCl 6M y EDTA 200Mm). Posteriormente los animales fueron eutanasiados por sobredosis de anestesia.

Diagnóstico de *T.cruzi* mediante la Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

La técnica de PCR fue realizada en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

1- Obtención del ADN

El ADN fue obtenido según metodología estándar utilizada para el Kit QIamp DNA Mini Kit Blood (Labtrade Inc.USA).

2- Amplificación y detección de región hipervariable de los minicírculos del kADN de *T. cruzi*. Del ADN que se obtuvo, se extrajo 20 µl, se agregó a un tubo de PCR con una solución compuesta por Tris-HCl 200 mM pH 8,4 y KCl 500 mM; dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM; MgCl₂ 1,5 mM; Taq DNA Polimerasa (2,5 U / µl); primers 121 y 122, 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/1min. --- 64 °C/2min., 33 ciclos de 94 °C/min --- 64 °C/min y un ciclo final de 74 °C/10 min.

4- Electroforesis y visualización

Con el fin de visualizar el producto de la amplificación, se utilizó 15 µl de las muestras, mezclándolas con 5 µl de solución 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 µl de Bromuro de Etidio 10mg/ml, en solución TBE. Además se utilizó un marcador de peso molecular (Φ X 174 DNA Hae III, Life Technologies, Inc.USA). Al terminar el proceso de electroforesis se observará con un transiluminador de luz ultravioleta.

5- Las muestras positivas fueron aquellas que presentaron una banda de 330 pb, correspondiente a la región hipervariable del minicírculo del kADN del *T. cruzi*, estas se registraron fotográficamente.

(García, 2001)

Tipificación mediante hibridación con sondas específicas para cada uno de los *T. cruzi* presente en los animales.

La caracterización de las distintas formas clonales de *T. cruzi* se realizó por dos métodos: la prueba Southern blot, con hibridación mediante sondas de ADN correspondiente a los linajes TcI (silvestre), TcII (domiciliario) y por medio de sondas radioactivas, usando el protocolo descrito por Solari *et al.* (2001).

Se usaron sondas para determinar clones perteneciente a los linajes nombrados anteriormente que se encuentran presentes en los micromamíferos.

Las sondas fueron:

- TcI [sp104c11 (clon 19)]
 - TcIIb [CBBc13 (clon 32)]
 - TcIIc [NRc13 (clon 39)]
 - TcIIe [v195c11 (clon 43)]
- } DTU I (Asociado al ciclo silvestre).
- } DTU II (Asociado al ciclo doméstico).

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de χ^2 para determinar independencia entre las variables: Especie reservorio, Área (que refleja un tipo de vector asociado), y clon de *T. cruzi*.

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados desde lo más general a lo más específico,

Primero se expondrán los resultados de diagnóstico para *T. cruzi* por área, posteriormente se expondrán los resultados diagnósticos para el parásito para el total de especies reservorias capturadas dentro de las 3 áreas, luego se mostrarán resultados diagnósticos para especies reservorias dentro de cada área.

En una última etapa, se presentarán los resultados de la prueba de hibridación utilizada en la determinación de clones del parásito sobre los ejemplares de especies reservorias que fueron diagnosticadas como positivas.

Análisis por Área:

Cuadro 3.- Prevalencia muestral para la infección por *T. cruzi*, obtenida mediante la reacción de PCR*, para el grupo de micromamíferos, según área en estudio. Capturados dentro de las tres áreas en estudio, durante el periodo 11/07 y 03/08.

Área \ Abundancia	N° total de micromamíferos capturados	N° de micromamíferos positivos	Prevalencia Muestral
Calera de Tango (<i>T. infestans</i>)	41	12	29,3%
R.N. Las Chinchillas (<i>M. spinolai</i>)	37	12	32,4%
Putendo (<i>M. infestans</i> + <i>M. spinolai</i>)	35	4	11,4%
Total	113	28	24,7%

La prevalencia general para el parásito *T. cruzi* fue de 24,7% (28/113).

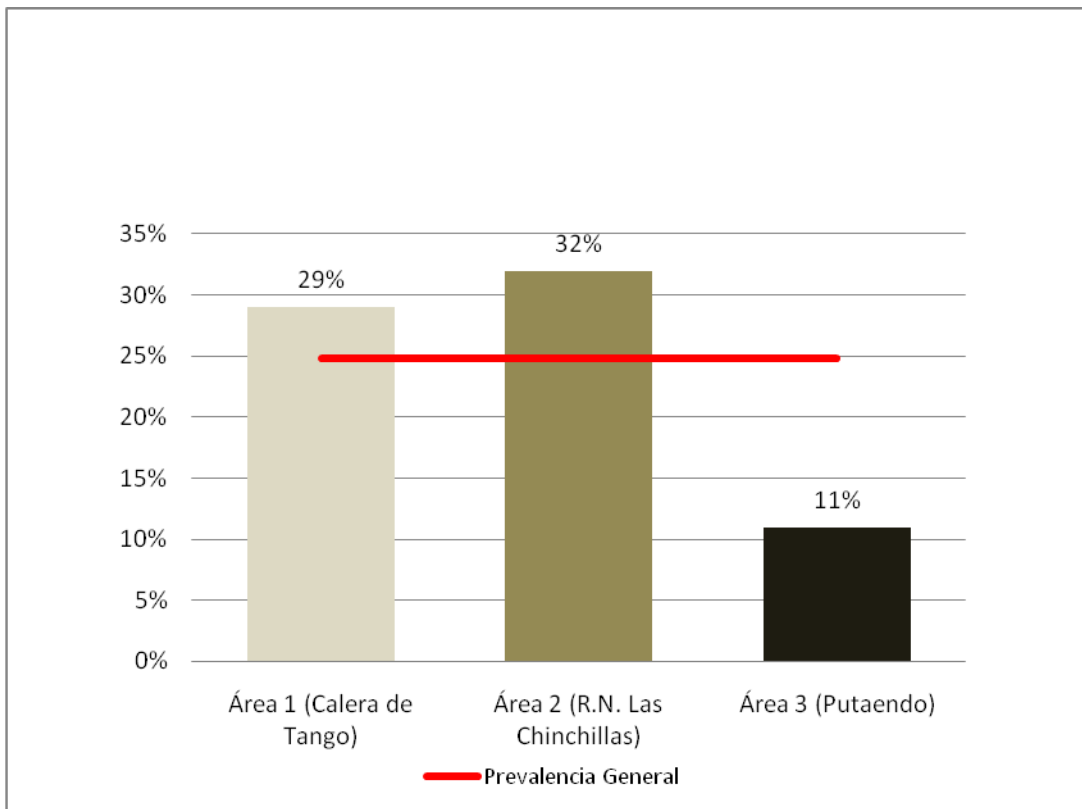


Figura 3.- Prevalencia muestral por área en estudio para la infección por *T. cruzi* y prevalencia muestral general.

Podemos apreciar en este gráfico que el área 3, Putando donde conviven las dos especies vectoras presenta una menor prevalencia, no obstante según la prueba estadística llevada a cabo esta diferencia no es significativa.

El Resultado de la Prueba χ^2 (Anexo 1), para la evaluación en la distribución de prevalencia del parásito, para los micromamíferos según área de estudio, resultó no ser significativo para la variable área ($\chi^2 = 4,95$; $df = 2$; $p > 0,05$).

Por lo tanto no existen diferencias significativas entre las prevalencias muestrales de infección por *T. cruzi* en micromamíferos para los distintos tratamientos vectoriales evaluados.

(Área 1 = *T. infestas*; Área 2 = *M. spinolae*; Área 3 = *T. infestas* + *M. spinolae*).

Análisis por especie micromamífera:

Las prevalencias para cada especie micromamíferas, calculada de los ejemplares por especie capturados fueron las siguientes:

Cuadro 4.- Tasa de infección por *T. cruzi*, obtenida mediante la reacción de PCR* para cada especies micromamífera, en relación al total de capturas por especies, durante el periodo 11/07 y 03/08.

Especie	N° total de ejemplares capturados	N° de ejemplares positivos	Tasa de Infección
<i>R. rattus</i>	27	10	37%
<i>P. darwini</i>	26	4	15%
<i>O. degus</i>	24	7	29%
<i>T. elegans</i>	11	1	9%
<i>R. norvegicus</i>	10	1	10%
<i>A. olivaceus</i>	8	4	50%
<i>A. bennetti</i>	4	1	25%
<i>O. longicaudatus</i>	2		0%
<i>A. longipilis</i>	1		0%
Total	113	28	25%

El resultado de la Prueba χ^2 (Anexo 2), para la evaluación en la distribución de la variable tipo de diagnóstico, para los micromamíferos según especie en estudio, resulto no ser significativo para la variable especie de micromamífero ($\chi^2 = 8,81$; $df=5$; $p > 0,05$).

*Para evitar errores, las especies *A. bennetti*, *O. longicaudatus*, *A. longipilis* no se incluyeron en este análisis, puesto que la abundancia absoluta esperadas fueron menores a 1.

Por lo tanto no existen diferencias significativas entre las prevalencia de infección por *T. cruzi* en micromamíferos para las distintas especies en estudio.

Analisis por grupo de especies micromamíferas capturadas dentro de cada Área:

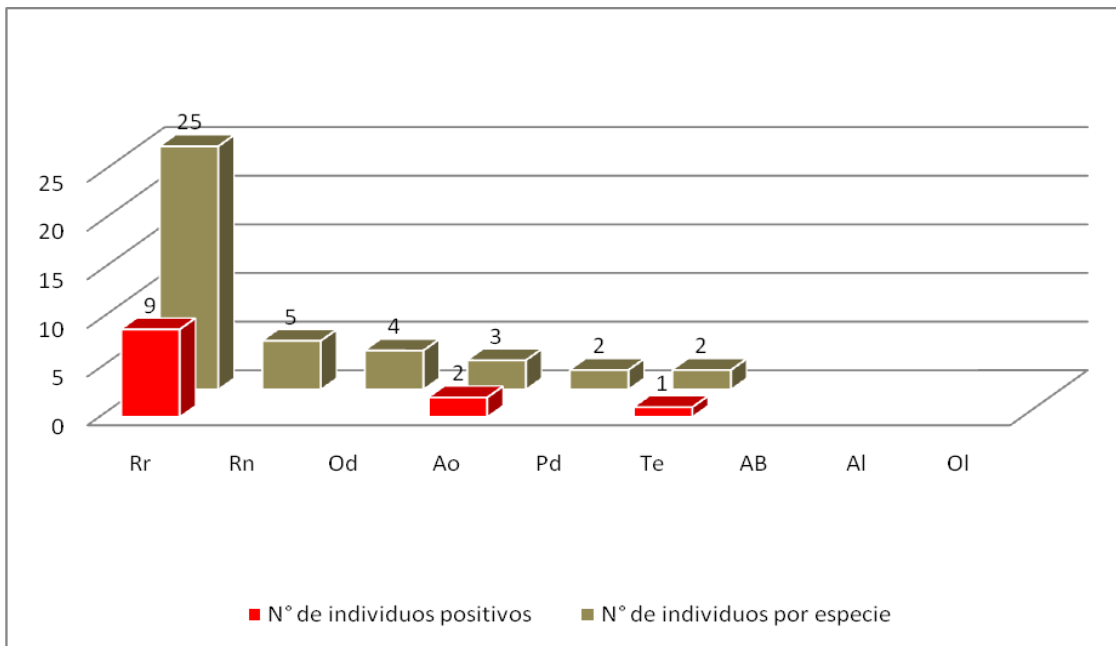


Figura 4.- N° de individuos positivos a la infección por *T. cruzi* para cada especies micromamífera en relación al total de capturas por especie, dentro del Área 1 (Calera de Tango), durante el periodo 11/07 y 03/08.

Podemos apreciar que la especie *R. rattus* que se encuentra en mayor abundancia, es la que se encuentra más parasitada.

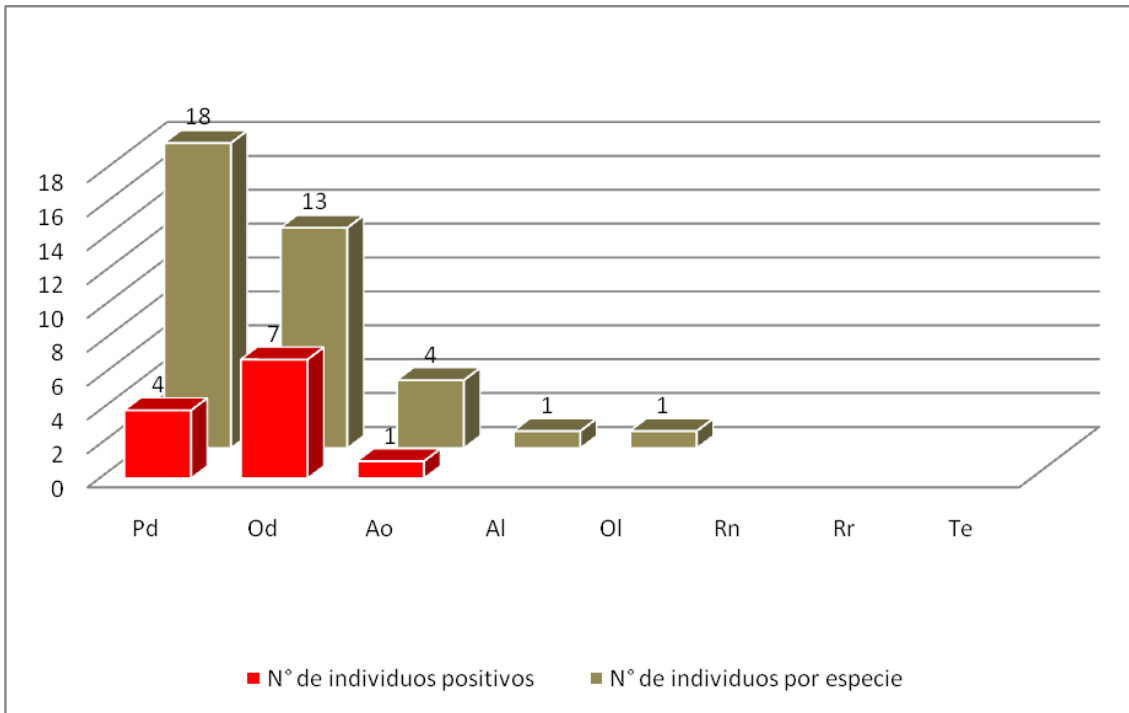


Figura 5.- N° de individuos positivos a la infección por *T. cruzi* para cada especies micromamífera en relación al total de capturas por especie, dentro del Área 2 (R. N. Las Chinchillas), durante el periodo 11/07 y 03/08.

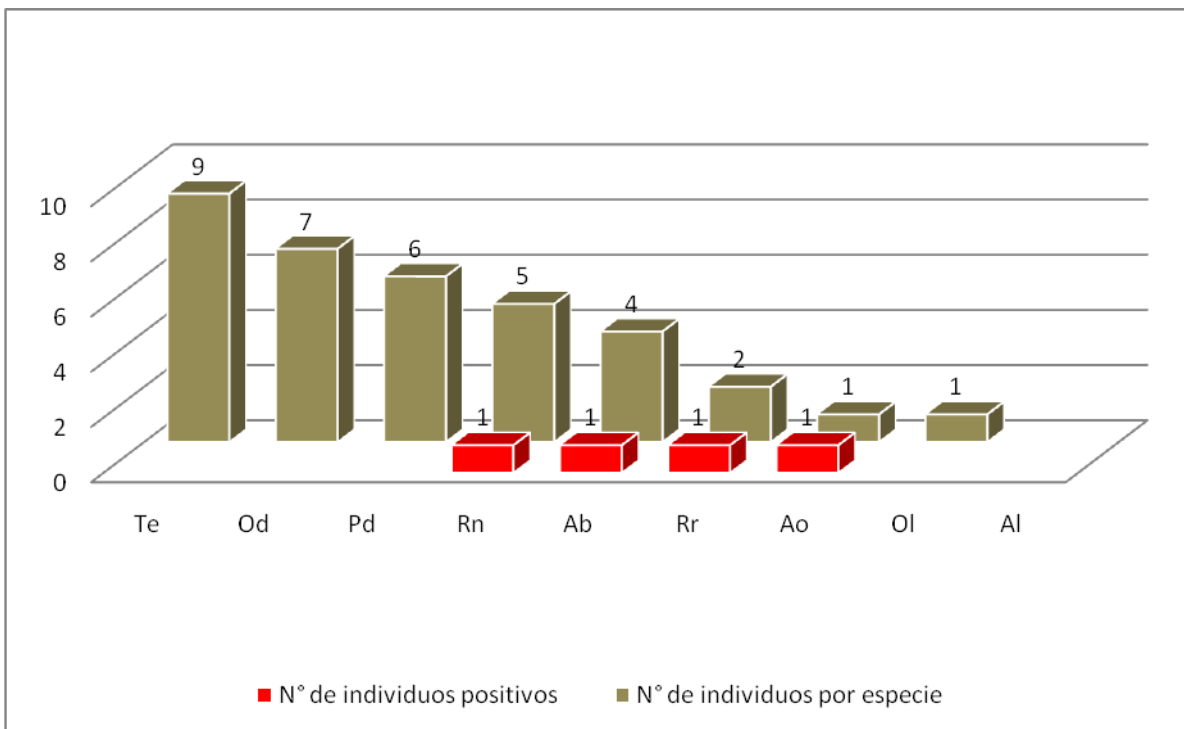


Figura 6.- N° de individuos positivos a la infección por *T. cruzi* para cada especie micromamífera en relación al total de capturas por especie, dentro del Área 3 (Putando), durante el periodo 11/07 y 03/08.

En los dos gráficos anteriores vemos que el comportamiento de infección no es como en el área 1, pero lamentablemente para sacar conclusiones más certeras se debiese obtener mayores individuos por especies para someter a prueba de χ^2 , llama la atención que en *T. elegans* a pesar de ser una especie depredadora de Triatominos, y de la abundancia relativa en que se encontró en el área 3 (Putando), ningún ejemplar de los 9 capturados se haya encontrado parasitado con *T. cruzi*.

A continuación se grafican las distintas tasas de infección ordenada por especies encontrada en cada área.

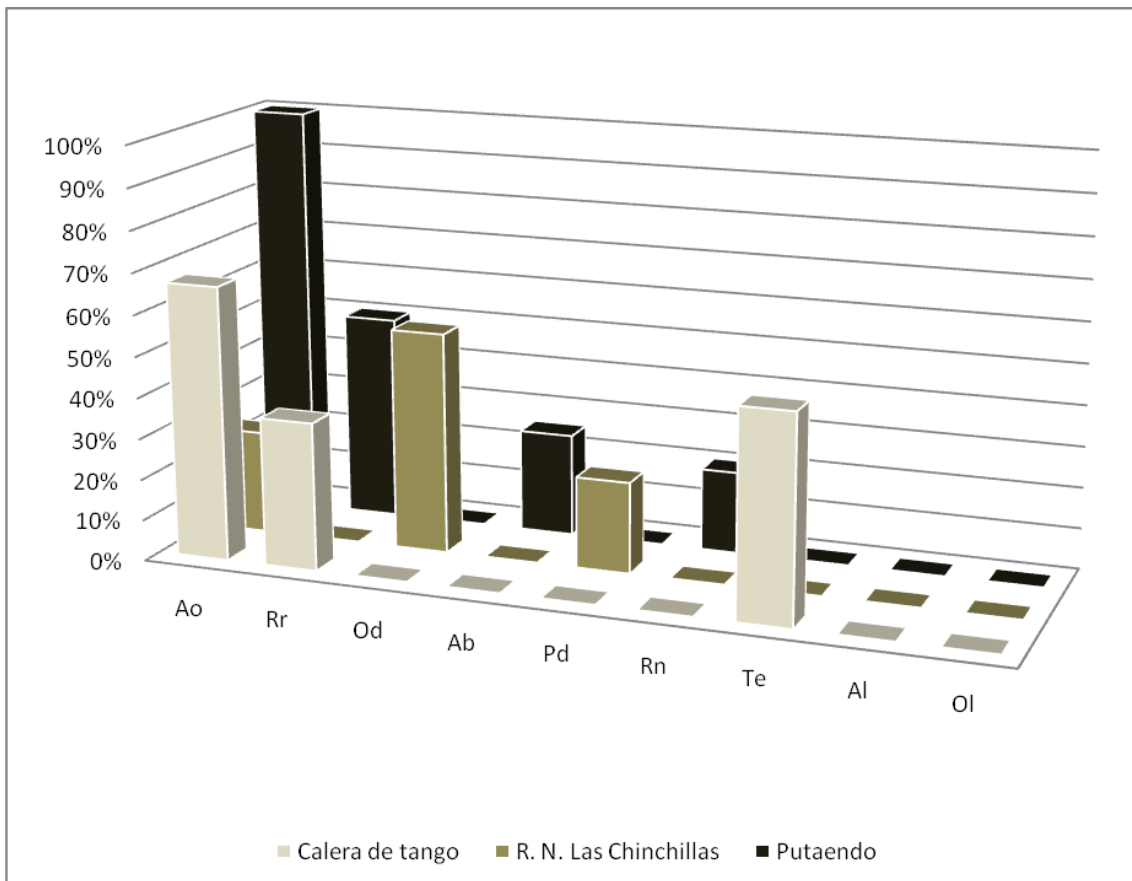


Figura 7.- Tasa de infección de *T.cruzi*, para cada especie micromamífera según área en estudio.

Respeto a esta figura podemos evidenciar y referirnos a la infección en múltiples hospedadores y a las actitudes eclécticas del parásito *T. cruzi*, adaptándose y modulándose a las especies reservorias presentes en el área, como método de supervivencia para la especie este resulta ser un mecanismo bastante exitoso.

La única comparación que se pudo realizar, entre especies por área, debido a la baja abundancia absoluta en que se encontraron algunas especies, fue la de la agrupación de todas las especies silvestres (*P. darwini*, *O. degus*, *A. olivaceus*, *A. benetti*, *O. longicaudatus*, *A. longipilis*) por área.

Cuadro 5.- Prevalencia para la infección por *T. cruzi*, obtenida mediante la reacción de PCR*, para el grupo de Roedores Silvestres, según área en estudio. Capturados dentro de las tres áreas en estudio, durante el periodo 11/07 y 03/08.

Área \ Abundancia	N° total de Roedores Silvestres capturados	N° de Roedores Silvestres positivos	Prevalencia
Área 1 (Calera de Tango)	9	2	22%
Área 2 (R.N. Las Chinchillas)	37	12	32%
Área 3 (Putando)	19	2	11%
General	65	16	25%

El resultado de la Prueba χ^2 (Anexo 3), para la evaluación en la distribución de la variable tipo de diagnóstico, según grupo “Roedores Silvestres”, por área resultó no ser significativo para las variables especie animal y área asociada ($\chi^2 = 3,27$; $df=2$; $p > 0,05$)

Por lo tanto no existen diferencias significativas entre las tasas de infección por *T. cruzi* entre los grupo de roedores silvestres para las distintas áreas en estudio.

Por último la siguiente figura muestra, los resultados de la hibridación sobre los individuos infectados con *T. cruzi*, agrupados por área de estudio.

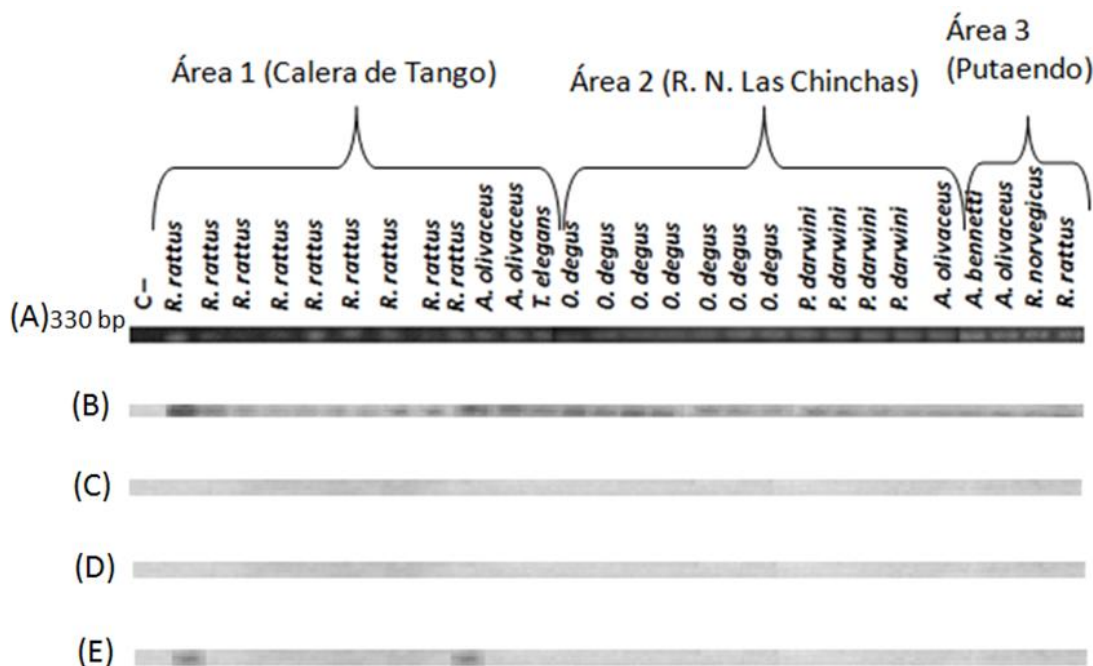


Figura 8.- Visualización de los individuos positivos para cada especie por Área en estudio, de los resultados de la electroforesis mediante la Técnica del PCR*, y resultados de la hibridación para estos individuos positivos con sondas específicas. (Individuos capturados dentro de las tres áreas en estudio, durante el periodo 11/07 y 03/08).

*Región hipervariable del ADNk de minicírculos de *T. cruzi*.

(A) = Amplificados de *T. cruzi*, marcados con Bromuro de Etidio; (C -) = Control negativo.

Resultados de la hibridación, para los genotipos específicos (B) = TcI [sp104cl1 (clone19)]; (C) = TcIIb (CBBcl3); (D) = TcIIId (NRcl3) y (E) = TcIIe (v195cl1).

El 93% de los individuos positivos resultaron sensibles solamente a la hibridación con el clon TcI (Linaje DTU I), mientras que el 7% del total de individuos positivos,

resultaron sensibles a los clones TcI (Linaje DTU 1) y TcIIe (Linaje DTU 2), estos individuos eran 2 ejemplares de *R. rattus* obtenidos en el área 1 (Calera de Tango).

DISCUSIÓN

Es indispensable mantener una mirada ecosistémica del fenómeno zoonótico de la enfermedad de Chagas, en donde los investigadores observen en su conjunto al sistema “vector-reservorio” como un hábil mantenedor de las poblaciones de clones de *T. cruzi* dentro del ambiente. Los intentos de evaluar una zona endémica con los actores de este sistema por separado no han permitido entender la distribución de clones dentro de los distintos ciclos (doméstico y silvestre) (Figura 2).

La clasificación en ciclos resulta ilustrativa para poder simplificar y ejemplificar la epidemiología de la enfermedad Chagas, pero en la práctica estos ciclos no se encuentran limitados en la naturaleza, puesto que por un lado tenemos al vector doméstico (*T. infestans*) asilvestrandose debido principalmente al tratamiento antivectorial, y por otro lado tenemos al vector silvestre (*M. spinolai*) con un potencial asombroso en cuanto a su capacidad vectorial (Sagua *et al.*, 2000), adaptándose a incorporar a los seres humanos en su dieta, con presencia de clones definidos como más prevalentes en humanos y por último acercándose a hábitat humanos, fenómeno no lejano a otros vectores silvestres de Latinoamérica descrito por diversos autores.

Debemos considerar que la infección en los micromamíferos para determinada zona va a depender de la presencia de determinada especie en el área, y de su abundancia relativa (Galuppo *et al.*, 2009).

Esta variable de distribución y abundancia de especies micromamíferas estaría condicionada por: oferta de alimentos, clima, y presencia de depredadores (principalmente aves rapaces y zorros) (Muñoz, 2001).

También debemos considerar variables de la propia especie como lo es el ámbito de hogar de los micromamíferos el cual va desde 1.154 m², hasta un máxima de 3.781 m² (Coto, 1997).

Los estudios sobre la infección en micromamíferos detectadas por métodos de PCR en Chile, son pocos, el primero fue llevado a cabo por (Rozas *et al.*, 2005); dentro de la Reserva Nacional Las Chinchillas, y se vio mediante PCR que la tasa de infección era de: *T. elegans*: 46% (6/13), *A. olivaceus*: 45% (20/44), *O. degus*: 42% (19/45), *P. darwini*: 41% (23/55).

Posteriormente Galuppo *et al.*, (2009), obtuvo los siguientes reportes de tasas en el área de Calera de Tango: *O. degus*: 12% (7/60), *P. darwini*: 25% (1/4), *R. rattus*: 28% (10/44).

Se aprecia que ante la evaluación estadística correspondiente a la tasa de infección por especie para las zonas estudiadas con anterioridad, no existen diferencias significativas, en cuanto a la prevalencia detectada en la presente investigación (Anexo 4, Anexo 5).

En la comparación estadística con la investigación de Galuppo *et al.*, (2009), las especies *O. degus* y *P. darwini* no se pudieron someter a evaluación por la baja abundancia en que se encontraron.

Para este trabajo se postuló que existiría una diversidad clonal para las especies reservorias, acorde a lo que se había descrito en la literatura, y que esta diversidad podría tener una distinta distribución por área dependiendo del vector que estuviese asociada a cada área en estudio. Era esperable descubrir mayor presencia de clones silvestres asociados al vector silvestre, viceversa para el vector domestico y en el área 3 donde encontramos a los dos vectores juntos era esperable encontrar una situación intermedia en cuanto a la abundancia relativa de los clones.

Es por eso que el hallazgo de mayor prevalencia (93%) del clon Tc1 (DTU 1) en los reservorios silvestres, llama la atención, puesto que no sigue el patrón esperado según la presencia del vector por área, ni tampoco se encontraron resultados similares a los documentados en investigaciones previas para los micromamíferos capturados en Calera de Tango (Área 1) (Galuppo *et al.*, 2009), y para Reserva Nacional Las Chinchillas (Área 2) (Rozas *et al.*, 2007).

Estos antecedentes en una primera lectura nos demuestran que sería imprudente reportar un patrón definido y constante para la distribución clonal a nivel de micromamíferos reservorios.

Es de importancia considerar como una variable en los resultados de la evaluación clonal, el método diagnóstico utilizado. Para esta investigación los resultados comparativos respecto a los reportados anteriores (Rozas *et al.*, 2007), (Galuppo *et al.*, 2009). muestran una baja diversidad clonal en los micromamíferos positivos, este fenómeno pudiese entenderse debido a la baja intensidad de banda presentada en visualización del ADN marcado con bromuro de etidio posterior a la electroforesis, esto podría indicar que hubo una baja cantidad de material genético para la hibridación y que por este motivo no logramos visualizar otros clones que se encuentran en una menor cantidad en las especies reservorias (Rozas *et al.*, 2007), (Galuppo *et al.*, 2009).

También no debemos perder de vista, para explicarnos el fenómeno de baja sensibilidad por tipo de clon, que la muestra analizada mediante PCR fue sanguínea, por lo tanto dentro de los 0,5 ml de sangre obtenidos, debió haber estado circulando el parásito o parte de él para poder ser detectado por el análisis.

Otra variable de importancia a considerar en las evaluaciones de distribución y abundancia clonal es el fenómeno de amplificación clonal reportado en las especies vectoras (Campos, 2008).

Coronado *et al.*, (2006), detectó mediante PCR presencia de TcIIe en *T. infestans*, que fueron infectadas mediante xenodiagnóstico con pacientes chagásicos crónicos que ante la prueba PCR en sangre no presentaban el clon mencionado. En un estudio similar, llevado a cabo por Campos (2008) pero ocupando ahora reservorios silvestres (*O. degus* y *O. cuniculus*) se analizó la sangre mediante PCR, y se comparó con examen de xenodiagnóstico con: *M. spinolai* y *T. infestan*. A estos se les realizó la prueba de PCR en sus deyecciones. El resultado del análisis sanguíneo fue negativo, no obstante la muestra fecal proveniente de los vectores infectados mediante xenodiagnóstico de los ejemplares de *O. degus* fueron positivos, estableciéndose inclusive que *M. spinolai* detecta una tasa de infección más alta y una mayor variedad de genotipos en

comparación a *T. infestans*. Por lo tanto se advierte a través de este estudio la mejor capacidad de amplificación que podría tener *M. spinolai* en comparación a *T. infestans*.

Por lo tanto de este modo queda comprobado el aumento de la sensibilidad en la técnica del PCR en cuanto a la capacidad para detectar tanto la infección como los clones circulantes para los hospederos (seres humanos y micromamíferos), con la utilización de previo xenodiagnóstico.

Estas variables que podrían interferir en los resultados son importantes de consideraran tanto para esta investigación como para otras. Los resultados de este trabajo sumado a la investigación llevada a cabo por Campos, (2008), sugieren que el mejor método de detección de clones y de comparación en estas 3 áreas sería la toma de muestra en micromamífero usando xenodiagnóstico con el vector *M. spinolai*, puesto que tenemos que considerar la importante variable de amplificación y/o selección clonal que ocurre según hospedero.

De este modo si hacemos un pasaje común de las especies reservorios a nivel silvestre podremos por un lado aumentar la sensibilidad en la detección clonal, y volver los resultados mayormente comparables.

Se sugiere que las futuras investigaciones sobre los clones de *T. cruzi*, presentes en los micromamíferos sean llevados a cabo utilizando la técnica del xenodiagnóstico (con *M. spinolai*), puesto que de esta forma se aumenta la sensibilidad en la hibridación para la detección de los clones de micromamíferos (Campos, 2008), y también lograríamos disminuir los errores en las comparaciones interespecies.

Por lo tanto en conclusión podemos resumir que no se pudo determinar con claridad cuál es la distribución de los clones para las distintas especies reservorias, moduladas por un distinto tratamiento vectorial por:

- Debido a un número insuficiente de capturas para las distintas especies.
Se trabajo con un total de 35 capturas por área de micromamíferos, pero la abundancia y distribución de las especies por área fue variable, dependiendo de

factores medio ambientales, esto imposibilitó algunos análisis interespecies, por tener un número insuficiente de capturas.

- Existencia de una intensidad de banda insuficiente, dado por una baja cantidad de material genético marcado con bromuro de etidio, lo que complicó la detección de clones durante el análisis de hibridación. Esto principalmente se debe a que la infección en micromamíferos reservorios es crónica y generalmente a patógena, por lo tanto aunque presenten el parásito, este no se va encontrar circulando en sangre, sino que podría estar ubicado en órganos distintos como, miocardio, hígado e intestinos. Esta característica de la infección en reservorios disminuye las posibilidades de detección del parásito, y si este se encuentra en sangre es esperable que sus concentraciones sean bajas.
- Distinta distribución y abundancia de las especies reservorias, lo que limitan la posibilidad de comparación entre especies dentro de cada área.
- Los resultados obtenidos en nuestra investigación difieren de lo publicado hasta la fecha por la literatura.
- Fenómenos de selección y/o amplificación clonal en especies hospederas y vectoras.

CONCLUSIONES

No obstante la distribución clonal, podemos establecer que la distribución del parásito en las especies reservorias no dependió de las especie micromamífera muestreadas ni de las especies vectoras presentes en el área investigada.

El 93% de los individuos positivos resultaron sensibles solamente a la hibridación con el clon TcI (Linaje DTU I), mientras que el 7% del total de individuos positivos, resultaron sensibles a los clones TcI (Linaje DTU I) y TcIIe (Linaje DTU 2), estos individuos eran 2 ejemplares de *R. rattus* obtenidos en el área 1 (Calera de Tango).

Se capturó un total de 113 micromamíferos, los cuales presentaron una distinta distribución y abundancia según el área al cual pertenecían.

Los individuos con mayor abundancia relativa encontrados durante el periodo noviembre del 2007 y marzo del 2008 fueron; *R. rattus* en Calera de Tango, *P. darwini* en Reserva Natural las Chinchillas y *T. elegans* en Putaendo.

ANEXOS

Anexo 1.- Resultado de la Prueba χ^2 , para la evaluación de en la distribución de la variable tipo de diagnóstico, para los micromamíferos según área en estudio.

Diagnóstico/Área	Área 1 (Calera de tango)	Área 2 (R.N. Chinchillas)	Área 3 (Putando)	Total
Positivo	12	12	4	28
Negativo	29	25	31	85
Total	41	37	35	113
χ^2 calculado	4,95			
χ^2 , df 2, 0,05 (tabla)	5,99			

Anexo 2.- Resultados de Prueba χ^2 , para la evaluación en la distribución de la variable tipo de diagnóstico, para los micromamíferos según especie en estudio.

Diagnóstico\Especie	Rr	Pd	Od	Te	Rn	Ao	Total
Positivo	10	4	7	1	1	4	27
Negativo	17	22	17	10	9	4	79
Total	27	26	24	11	10	8	106
χ^2 calculado	8,81973632						
χ^2 , df 5, 0,05 (tabla)	11,07						

Anexo 3.- Resultado de la Prueba χ^2 , para la evaluación de en la distribución de la variable tipo de diagnóstico, para los Roedores Silvestres, según área en estudio.

Grupo	Diagnos.\Área	Calera	Chinchillas	Putando	Total 1	Total 2
Roedores	+	2	12	2	16	
Silvestres	-	7	25	17	49	
Total		9	37	19		65
χ^2 calculado	3,27869223					
χ^2 ; df 2; 0,05	5,99					

Anexo 4.- Evaluación estadística entre la tasa de infección de *T. cruzi* para las especies capturadas dentro de La Reserva Nacional Las Chinchillas, tomando los datos de Rozas (2005) y los de la presente investigación.

Evaluación entre *P. darwini*:

Diagnóstico/Investigación	Rozas <i>et al.</i> , (2007)	Kretschmer, (2010)	Total
Positivo	23	4	27
Negativo	30	14	44
Total	53	18	71

	Point estimate	[95% Conf. Interval]	
Odds ratio	.3726708	.0797566	1.419693 (exact)
Prev. frac. ex.	.6273292	-.4196932	.9202434 (exact)
Prev. frac. pop	.2722372		
chi2(1) =		2.56	Pr>chi2 = 0.1099

Evaluación entre *O. degus*

Diagnóstico/Investigación	Rozas <i>et al.</i> , (2007)	Kretschmer, (2010)	Total
Positivo	19	7	26
Negativo	26	6	32
Total	45	13	58

	Point estimate	[95% Conf. Interval]	
Odds ratio	1.596491	.3851061	6.733869 (exact)
Attr. frac. ex.	.3736264	-1.596687	.851497 (exact)
Attr. frac. pop	.2011834		
chi2(1) =		0.55	Pr>chi2 = 0.4579

Evaluación entre *A. olivaceus*

Diagnóstico/Investigación	Rozas <i>et al.</i> , (2007)	Kretschmer, (2010)	Total
Positivo	20	1	21
Negativo	24	3	27
Total	44	4	48

	Point estimate	[95% Conf. Interval]	
Odds ratio	.4	.0072625	5.531319 (exact)
Prev. frac. ex.	.6	-4.531319	.9927375 (exact)
Prev. frac. pop	.2727273		
chi2(1) =		0.62	Pr>chi2 = 0.4298

Anexo 5.- Evaluación estadística para las prevalencias de *T. cruzi* de las especies capturadas en Calera de Tango, tomando los datos de Galuppo *et al.*, (2009) y los de la presente investigación.

Evaluación entre *R. rattus*

Diagnóstico/Investigación	Galuppo <i>et al.</i> , (2009)	Kretschmer, (2010)	Total
Positivo	10	9	19
Negativo	34	16	50
Total	44	25	69

	Point estimate	[95% Conf. Interval]	
Odds ratio	1.9125	.5604724	6.415291 (exact)
Attr. frac. ex.	.4771242	-.7842091	.8441224 (exact)
Attr. frac. pop	.1717647		
chi2(1) =		1.41	Pr>chi2 = 0.2355

BIBLIOGRAFIA

- ACUÑA, M.** 2001. Efecto del hospedero sobre el crecimiento poblacional de *Mepraia spinolai* (HEMIPTERA, REDUVIIDAE). Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 67 p.
- ANDRADE, S.G.** 1999. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strain and the importance of principal clones. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94 (Suppl 1.): 185-187.
- ANGEL, R., CHICHILLA, M., GUERRERO, O. & CASTRO, A.** 2007. Cinética de crecimiento *in vitro* de dos cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en células miocárdicas de roedores con diferente susceptibilidad. Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744)Vol.55(1):121-126.
- 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. Parasitol al día 14: 23-40.
- BARNABÉ, C., BRISSE, S., TIBAYRENC, M.** 2000. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. Parasitology, 120: 513-526. Cambridge University Press.
- 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(10):1230-1236.
- BRENER, Z.** 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Rev. Microbiol., 87: 347-382.
- BRIONES, MRS., SOUTO, RP., STOLF, BS., ZINGALES, B.** 1999 The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with

the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitology* 104: 219-232.

BRISSE, S., BARNABÉ, C. AND TIBAYRENC, M. (1998). *Trypanosoma cruzi*: how many relevant phylogenetic subdivisions are there? *Parasitology Today*. 14: 178-179.

BRUMPT, E. 1912. Le *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorrhinus magistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex boueti* et *Ornithodoros moubata*. Cycle évolutif de ce parasite. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 5:30-367.

CALDERÓN-ARGUEDAS O., CHINCHILLA M., GARCIA F., VARGAS M. 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. 1998. Biología comparada de *Mepraia spinolai* en condiciones de laboratorio y terreno: cinco años de estudio. *Parasitol. Día* 22 (3-4):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.

CARLIER, YVES. 2003. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). *EMedicine*.

CARREIRA, JCA., JANSEN, AM., LENZI, H., DEANE, MP. 1996. Histopathological study of *Didelphis marsupialis*. Natural and Experimental infections by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 609-618.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909.1:159-218.

CORONADO, X., ZULANTAY, I., ALBRECHT, H., ROZAS, M., APT, W., ORTIZ, Z., RODRIGUEZ, J., SANCHEZ, G., SOLARI, A., 2006. Variation in *Trypanosoma cruzi* clonal composition detected in blood patients and xenodiagnosis triatomines: implications in the molecular epidemiology of Chile. *Amij. Trop. Med. Hgy*. 74(6):1008-1012.

CORTÉS-JIMÉNEZ M, NOGUEDA B, ALEJANDRE R. 1994. Transmisión experimental de *Trypanosoma cruzi* por *Ornithonyssus bacoti*. *Vet. Méx.*, 25 (1).

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

DEANE, MP., JANSEN, AM. 1986. Another *Trypanosoma*, distinct from *Trypanosoma cruzi* multiplies in the lumen of the anal glands of the oposum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 131-132.

DE LUCA D'ORO, GM., C.N. GARDENAL, B. BERRET & J.V. CRISCI. 1993. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* population for Argentina estimated from enzyme polymorphism. *Parasitol* 107: 405-410.

DE SOUZA, W. 2009. Hospedador vertebrado. (En línea). Universidad Federal de Río de Janeiro, RJ, Brasil.

En: http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=11

Consultado: 20/12/2009.

DÍAS, JCP. 1987. Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitology Today* Volume 3, Issue 11, Pages 336-341.

DÍAS, JCP., SILVEIRA, AC., SCHOFIELD, CJ. 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 97: 603-612.

DOBSON, A. 2004. Population dynamics of Pathogens with multiple host species. *The American Naturalist* 164: S64-S78.

DONALD J. 1984. Roedores como plagas de productos almacenados, control y manejo. Oficina regional de la FAO para América latina y el Caribe. Santiago, Chile. 42 p.

EADS, RB., HIGHTOWER, BG. 1952. Blood parasites of southwest Texas rodents. *J Parasitol* 38: 89-90.

FELDHAMER, G.A. 2003. *Mammalogy: Adaptation, Diversity, and Ecology*. San Francisco: Mc Graw-Hill.

FLYNN, JJ., WYSS, AR. 1998. Recent advances in South American mammalian paleontology. *Tree* 13: 449-454.

FRIEN, WG., SMITH, JB. 1977. Factors affecting feeding by blood sucking insects. *Ann. Rev. Entomol.* 22: 309-331.

GALUPPO S., BACIGALUPO A., GARCÍA A., ORTIZ S., CORONADO X., CATTAN P.E., SOLARI A. 2009. Predominance of *Trypanosoma cruzi* genotypes in two reservoirs infected by sylvatic *Triatoma infestans* of an endemic area of Chile. *Acta tropica*, Volumen 111, Issue 1, Pages 90-93.

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 Ciencias Biológicas, mención en Parasitología. Santiago Chile. Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Escuela de Postgrado. 74 p.

HERRERA, L., URDANETA-MORALES, S. 1997. Synantropic rodent reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in the valley of Caracas, Venezuela. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 39: 279-282.

HERRERA, L., XAVIER, SC., VIEGAS, C., MARTINEZ, C., COTIAS, PM., CARRASCO, H., URDANETA-MORALES, S., JANSEN, AM. 2004. *Trypanosoma cruzi* in a caviomorph rodent: parasitological and pathological features of the

experimental infection of *Trichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). *Exp Parasitol* 107: 78-88.

JANSEN, A. M., SANTOS DE PINHO, A. P., LISBOA, C.V., CUPOLILLO, E., MANGIA, R.H., FERNANDES, O., 1999. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*; a still unsolved puzzle. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94 (1): 203-204.

JANSEN, AM., PINHO, AP., CUPOLILLO, E., MANGIA, RH., FERNANDES, O. 2000. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg:* 1-6.

JANSEN-FRANKEN, AM. 2009. Ecología.(En línea). Laboratorio de Biología de Tripanosomátidos, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ, Brasil.

En: http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=141

Consultado: 20/12/2009

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.

KIRCHHOFF, L. American Trypanosomiasis (Chagas' disease) - A tropical disease now in the United States. *N Engl J Med* 1993; 329: 639-44.

MACEDO, A.M. & S.D.J. PENA., 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today* .14: 119-123.

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

MAGALHAES, J.B., S.G. ANDRADE & I. SHERLOCK. 1996. *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after pasaje into autochatonous or foreign species of triatomine (Biological and biochemical patterns). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 38: 23-28.

MANN, FG. 1978. Los pequeños mamíferos de Chile. *Gayana: Zoología,* 40:1-342.

MILLS JN., CHILDS. 1998. Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance of human health. *Emerg Infect Dis* 4: 529-537.

MUÑOZ, C., 2001. Comparación de la reacción de la polimerasa en cadena con la detección microscópica directa de *Trypanosoma cruzi* en el *Triatoma infestans*; obtención del índice trypano/triatomino. Memoria Título médico veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 62 p.

MUSSER, G., CARLETON M. 1993. Family Muridae. In: D. E. Wilson and D.M. Reeder (eds.) *Mammals species of the world, a taxonomic and geographic reference*, 2 ed., Washington, D.C., pp 501-755, Smithsonian Inst. Press.

NEGHME, A., ROMÁN, J. 1948. Present state of Chagas disease surveys in Chile. *Am. J. Trop. Med.*, s1-28(6), pp. 835-839.

NÚÑEZ, F., CISTERNAS, P. 1991. Roedores domésticos I. Caracterización morfológica, conductual y sanitaria. *Monografías Medicina Veterinaria* 13: 55-64.

OLEA, A. 2007. Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Vectorial. *El Vigía electrónico* 25, 2007; volumen 10 (25): 52.

OLIVEIRA, R.P., BROUDE, N.E., MACEDO, A.M., CANTOR, C.R., SMITH, C.L., PENA, S.D., 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3776-3780.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE 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.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. 2007. IPA : Iniciativa de los Países Andinos de Control de la Transmisión Vectorial y Transfusional de la Enfermedad de Chagas. [en línea]: www.paho.org/spanish/AD/DPC/CD/dch-ipa.htm.

PINTO, CM., OCAÑA-MAYORCA, S., LASCANO, MS., GRIJALVA, MJ. 2006. Infection by trypanosomes in marsupials and rodent associated with human dwellings in Ecuador. *J Parasitol* 92: 1251-1255.

PINTO, D. 1990. Doença de Chagas Clínica e Terapêutica. Ministério de Saúde, Sao Paulo, Brazil.

PINTO, DÍAS, J.C., BRICEÑO – LEÓN, R., STORCINO, R. 1994. Aspectos sociales, Económicos, Políticos, Culturales y Psicológicos. En Enfermedad de Chagas. Sterino, Millei. Mosby Doyma Argentina. 536 p.

PINTO, C., OCAÑA-MAYORGA, S. LASCANO M., AND GRIJALVA. M. 2006. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in ecuador *Journal of Parasitology* 92(6):1251-1255.

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., BONILLA, A., MOYA, T., CHINCHILLA, M., 1998. Estudio sexológico por inmunofluorescencia de la enfermedad de Chagas en Costa Rica. *Parasitol* 22: 108-110.

RODHAIN, J., BRUTSAERT, P. 1985. L'évolution des *Trypanosoma lewisi* et *Trypanosoma cruzi* chez *Melophagus ovinus*. *CRC Biol.*, 118: 1228-1231

RODRÍGUEZ, E., BRICEÑO, L., CHIURILLO, MA., MOSCA, W, CAMPOS, Y. 2004. Tripanosomiasis americana: Aspectos teóricos. **In:** Curso Latinoamericano sobre

enfermedades infecciosas, 25 de octubre – 12 de Noviembre 2004. Instituto de Biomedicina, Universidad Central, Caracas, Venezuela. p. irr.

RODRIGUES, A., CORRÉA, V. 2009. Roedores. (En línea). Laboratorio de Biología de Tripanosomátidos, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ, Brasil.

En: http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=113

Consultado: 20/12/2009.

ROZAS, M., BOTTO-MAHAN, C., CORONADO, X., ORTIZ, S., CATTAN, P., SOLARI, A. 2005. Short report: *T. cruzi* infection in wild mammals from a chagasic area of Chile. Am. J. Trop. Med. Hyg. 73(3): 517-519.

ROZAS, M., BOTTO-MAHAN, C., CORONADO, X., ORTIZ, S., CATTAN, P., SOLARI, A. 2007. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. Am. J. Trop. Med. Hyg., 77(4), pp. 647–653.

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.

SAGUA, H., ARAYA, J., GONZALES, J., NEIRA, J. 2000. *M. spinolai* in the southeastern Pacific Ocean coast (Chile). – First insular record and feeding pattern on the Pan de Azúcar Islan. Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 95: 167-70.

SHAPIRO TA, ENGLUND PT. 1995. The structure and replication of kinetoplasto DNA. Annual Review of Microbiology; 49: 117-143.

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.

SCHENONE, H., VILLARROEL, F., ROJAS, A., ALFARO, E. 1991. Factores biológicos y ecológicos en la epidemiología de la Enfermedad de Chagas en Chile. Boletín Chileno de Parasitología. 35: 42-54.

SCHOFIELD, C.J. 1994. Triatominae. Biología y control. Eurocommunica Publication. West Sussex, England. 183 p.

SCHOFIELD, C.J. 2000. *Trypanosoma cruzi* – the vector – parasite paradox. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 22: 583-588.

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 alvicentris*) en Santiago del Estero, Argentina. Rev Panamericana de Salud Pública 6 (6): 371-377.

SOLARI, A., CAMPILLAY, R., ORTIZ, S., WALLACE, A. 2001. Identification of *Tripanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. Exp. Parasitol 97: 226-233.

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.

SOUTO, R. P., FERNANDES, O., MACEDO, A. M., CAMPBELL, D. A. AND ZINGALES, B. (1996). DNA markers define twomajor phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*.Molecular and Biochemical Parasitology. 83: 141-152.

SPOTORNO, AE., WALKER L. 2000. Origen y evolución de los mamíferos chilenos. En: Muñoz-Pedrerros A. y Yáñez J. (eds.). Mamíferos de Chile; 217-227. Ediciones CEA, Valdivia, Chile.

TIBAYRENC, M. 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Advances in Parasitology. 36: 47-115.

TIBAYRENC, M. 1996. Towards a unified evolutionary genetics of microorganisms. Annual Review of Microbiology. 50: 401-429.

TIBAYRENC, M. 1998a. Beyond strain typing and molecular epidemiology: integrated genetic epidemiology of infectious diseases. Parasitology Today. 14: 323-329.

TIBAYRENC, M. 1998b. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. International Journal for Parasitology. 28: 85-104.

TIBAYRENC, M. 1998c. Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 93: 577-580.

THIERMANN, A. 2004. Las enfermedades emergentes y sus consecuencias para el comercio mundial. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2004; 23 (2): 701-708.

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.

VARELLA, C., XAVIER, S. 2009. La Biogeografía. (En línea). Laboratorio de Biología de Tripanosomátidos, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ, Brasil.
En: http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=30
Consultado: 20/12/2009

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

VELASCO, O. 1991. La enfermedad de Chagas. Una Revisión Histórica Sucinta y Parcial de lo que Ocurre en México y en el Mundo. Publicación técnica del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica #8. INDRE, México, D. F.

WESTENBERGER, SJ., BARNABE, C., CAMPBELL, DA., STURM NR. 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171: 527-543.

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.

XAVIER, SCC., VAZ, VC., D'ANDREA, PS., HERRERA L., EMPERAIRE L., ALVES, JR., FERNANDES, O., FERREIRA, LF., JANSEN, AM. 2007. Mapping of the distribution of *Trypanosoma cruzi* infection among small wild mammals in a conservation unit and its surroundings (Northeast-Brazil). *Parasitol Int* (in press).

YEO, M., ACOSTA, N., LLEWELLYN, M., SÁNCHEZ, H., ADAMSON, S., MILES, GAJ., LÓPEZ, E., GONZÁLEZ, N., PATTERSON, JS., GAUNT, MW., DEARIAS, AR., MILES, MA. 2005. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol* 35: 225-233.

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

