



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

COMPARACIÓN DE LINAJES DE *Trypanosoma cruzi* EN *Triatoma infestans* Y *Mepraia spinolai*

Camila Adriana Ihle Soto

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

PROFESOR GUÍA: Dr. Pedro E. Cattán Ayala

Proyectos FONDECYT 1100339 y 1120122

SANTIAGO, CHILE
2014



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

COMPARACIÓN DE LINAJES DE *Trypanosoma cruzi* EN *Triatoma infestans* Y *Mepraia spinolai*

Camila Adriana Ihle Soto

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA: Pedro E. Cattán Ayala
PROFESOR CONSEJERO: Aldo Solari
PROFESOR CONSEJERO: Galia Ramírez

SANTIAGO, CHILE
2014

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por apoyarme siempre en todas las cosas que decido, por dejarme tener muchos perros, por siempre estar ahí para mí y por aguantar mi mal genio.

A Eduardo Costoya por ser el mejor compañero de universidad, de tesis y de vida, por enseñarme que nunca nada es tan terrible y por hacer que todo sea mejor cuando está conmigo.

A Daniela Benavides por ser siempre mi mejor amiga.

A Nicole Misad, Catalina Hurtado, Catalina Valdés, Fernanda Olivares y María Paz Millar por acompañarme en este camino, por cada vez que sufrimos en conjunto y por cada vez que nos matamos de la risa.

A Fito, Merlín, Luna y Bellota por cada fiesta de bienvenida diaria, por la compañía incondicional y por alegrarme el día cada vez que mueven la cola.

A Antonella Bacigalupo por responder mis infinitas dudas, por todas las correcciones y por todo el tiempo que dedicó.

Al Dr. Cattan y Dr. Solari por su siempre buena disposición y guía en el desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

	Página
Introducción	1
Revisión Bibliográfica	3
Objetivos	7
General	7
Específicos	7
Material y Método	8
Especímenes.....	8
Extracción DNA y diagnóstico de infección	8
Genotipificación	9
Análisis estadístico.....	11
Resultados	13
Discusión	19
Conclusión	27
Bibliografía	28

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla Nro. 1. Clima y vegetación característica por localidad	8
Tabla Nro. 2. Muestras genotipificadas según especie de triatomino, localidad de captura y estación del año.....	10
Tabla Nro. 3. Muestras no incluidas en el análisis.....	13
Tabla Nro. 4. Hibridación de muestras efectivamente transferidas según especie de triatomino.....	13
Tabla Nro. 5. Hibridación de muestras efectivamente transferidas según localidad de captura del vector.....	14
Tabla Nro. 6. Linajes en infecciones únicas y mixtas por especie de triatomino.....	15
Tabla Nro. 7. Linajes en infecciones únicas y mixtas por localidad de captura del vector.....	16
Tabla Nro. 8. Resultados de la prueba de Tukey HSD comparando índices de Shannon Weaver H' entre localidades.....	17

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura Nro. 1: Membranas exhibiendo muestras con infecciones únicas y mixtas....	14

RESUMEN

Debido a la gran importancia eco-epidemiológica y clínica de los linajes de *Trypanosoma cruzi*, en este estudio se analizaron 229 muestras de *Triatoma infestans* (56,3%) y *Mepraia spinolai* (43,7%) silvestres infectados por este protozoo, provenientes de seis localidades de la zona endémica de Chile. Se utilizó la técnica de DNA blot, para la detección de la región hipervariable de los minicírculos del kDNA a través de sondas específicas marcadas para los linajes TcI, TcII, TcV y TcVI.

TcI resultó el linaje más abundante en ambas especies de triatomíneos y en la mayoría de las localidades, seguido de TcII. El linaje TcV se detectó exclusivamente en *T. infestans* de la localidad de Calera de Tango. Además, se observó una mayor cantidad y tipos de infecciones mixtas en esta última especie, asociado a un índice de diversidad de Shannon Weaver significativamente mayor. Finalmente, también se encontraron diferencias significativas en la proporción de los linajes TcI, TcV y TcVI según estación del año, siendo todos más frecuentes en verano.

Este estudio es la primera descripción de los linajes de *T. cruzi* circulando en las localidades de El Maqui, El Sobrante y El Atajo. Además muestra por primera vez una mayor diversidad de linajes y proporción de infecciones mixtas en *T. infestans* por sobre *M. spinolai*, y se analizan sus posibles causas e impactos.

Palabras clave: Linajes de *Trypanosoma cruzi*, *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai*.

ABSTRACT

Due to the great eco-epidemiological and clinical importance of *Trypanosoma cruzi* lineages, in this study I studied 229 samples of wild *Triatoma infestans* (56.3%) and *Mepraia spinolai* (43.7%) from 6 localities of the endemic zone of Chile. DNA blot analysis was used to detect the variable region of the kDNA minicircles through specific labeled probes for the lineages TcI, TcII, TcV and TcVI.

TcI was the most abundant lineage in both species of vectors and in most of the localities, followed by TcII. TcV was exclusively detected in *T. infestans* of the locality of Calera de Tango. In this last species, a greater number and more types of mixed infections were observed, associated to a significantly greater Shannon Weaver diversity index. Finally, a significant difference in the proportion of lineages TcI, TcV and TcVI by season of the year was also found, being all of them more frequent in summer than in winter.

This study is the first description of the *T. cruzi* lineages present in the localities of El Maqui, El Sobrante, and El Atajo. It also shows for the first time a greater diversity of lineages and proportion of mixed infections in *T. infestans* over *M. spinolai*, and its possible causes and impacts are analyzed.

Keywords: *Trypanosoma cruzi* lineages, *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai*

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una enfermedad parasitaria, endémica en 21 países de América, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta patología afecta alrededor de 8 millones de personas y representa la tercera enfermedad parasitaria de mayor impacto mundial (ISP, 2012). El parásito se transmite a través del contacto con heces contaminadas de insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (comúnmente llamadas vinchucas), aunque también existen otras formas de transmisión como la transfusional, transplacentaria, trasplantes de órganos, accidentes de laboratorio, vía oral y jeringas de drogadictos (Apt *et al.*, 2008).

Existen más de 140 especies de triatominos, la mayoría de los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en América. En Chile hay 4 especies de triatominos pertenecientes al Orden Hemiptera, Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae: *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai*, *Mepraia parapatrica* y *Mepraia gajardo*. En cuanto a reservorios, existen más de setenta géneros de mamíferos que se han encontrado infectados por este protozoo, entre ellos los humanos (ISP, 2012).

En humanos, la enfermedad de Chagas afecta principalmente a personas de áreas rurales desde México al centro de Chile y Argentina (Noireau *et al.*, 2009); sin embargo, en la última década su distribución se ha ampliado a EEUU, Canadá, Europa y Pacífico Occidental debido a las vías de infección alternativas, principalmente la transplacentaria y transfusional (OPS, 2004). En Chile, la población en riesgo se encuentra en zonas rurales y suburbanas desde Arica-Parinacota hasta la Región del Libertador Bernardo O'Higgins, correspondiente a la zona endémica del país. El año 2008 se estimaban cerca de 850.000 personas en riesgo de infección y 100.000 infectados (Apt *et al.*, 2008).

En el año 1990 más de 16 millones de personas se encontraban infectadas, por lo que se generó la Iniciativa del Cono Sur para el Control de la enfermedad de Chagas (INCOSUR-Chagas) con el objetivo de eliminar *T. infestans* de la zona doméstica y peridoméstica, eliminar otros triatominos de las viviendas y disminuir la transmisión por transfusiones de sangre (OPS, 2004). En Chile, se realizaron fumigaciones periódicas en viviendas y zonas peridomésticas de áreas endémicas y desde 1999 tiene certificación de la interrupción de la transmisión vectorial por parte de la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2004).

El agente infeccioso, *T. cruzi*, posee una gran variabilidad morfológica durante los diferentes estadios del ciclo infeccioso, existiendo al menos tres formas celulares: tripomastigote, no replicativo; epimastigote, replicativo dentro del vector; y el amastigote, replicativo en las células del mamífero (Noireau *et al.*, 2009). Además de esta variabilidad morfológica, *T. cruzi* posee una alta variabilidad genética, constituyendo diferentes genotipos o linajes del agente (Zingales *et al.*, 2009).

La enfermedad de Chagas presenta una gran variedad de cuadros clínicos y cursa con dos fases principales: aguda y crónica (Apt *et al.*, 2008). La fase aguda tiene una duración aproximada de dos meses luego de la infección y se caracteriza por una alta parasitemia. Esta fase generalmente es asintomática o leve y puede cursar con fiebre, cefalea, mialgias, disnea, dolor abdominal o torácico, entre otros. La fase crónica ocurre cuando el parásito invade la musculatura cardíaca, digestiva, o ambas, produciendo miocarditis crónicas, arritmias, cardiomegalia o megaesófago y megacolon, respectivamente (Apt *et al.*, 2008). En Chile, el 30% de los casos crónicos presentan la forma cardíaca y representan el 80% de las muertes (OPS, 2004), mientras que el 5-10% presentan megasíndromes, siendo el megacolon el más frecuente (Apt *et al.*, 2008).

Se considera que la enfermedad de Chagas posee una epidemiología compleja debido a la alta variabilidad presente en el agente infeccioso, la amplia variedad de especies de vectores, de hospederos y manifestaciones clínicas (Noireau *et al.*, 2009). Se han realizado diversos estudios para correlacionar estas variables con las diferentes subpoblaciones de *T. cruzi*, sin embargo, aún no se establecen asociaciones claras (Noireau *et al.*, 2009). En el presente estudio se busca identificar los diferentes linajes de *T. cruzi* en *T. infestans* y *M. spinolai* silvestres de seis localidades de la zona endémica de Chile.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En Chile se describen tres especies de triatominos silvestres: *M. spinolai*, *M. parapatrica* y *M. gajardoi*, siendo el género *Mepraia* endémico de Chile (Frías-Lasserre, 2010). *Mepraia spinolai* se encuentra entre la Región de Atacama y la del Libertador Bernardo O'Higgins habitando zonas pedregosas, madrigueras, nidos, troncos y ocasionalmente corrales y pircas periantrópicas (Frías-Lasserre, 2010). *Mepraia gajardoi* en cambio, se distribuye sólo en la costa norte de Chile y se asocia a nidos de aves marinas y cuevas de reptiles (Botto-Mahan *et al.*, 2008). *Mepraia parapatrica* se describió como especie en el año 2010, y se distribuye a lo largo de la costa norte, entre la II y III región, así como en la Isla Pan de Azúcar (Frías-Lasserre, 2010). Por otro lado, *T. infestans* es la única especie considerada doméstica y peridoméstica, habitando grietas en paredes, techos y gallineros; sin embargo, recientemente en Chile se ha vinculado con hábitats silvestres en la zona central asociada a *Puya* spp. y pilas de rocas (Bacigalupo *et al.*, 2006; 2010).

Todas las especies de triatominos nacen de huevos y poseen cinco estadíos antes de alcanzar la madurez sexual, proceso que demora al menos seis meses. Éstos pueden infectarse con *T. cruzi* en cualquier estadío posterior a su eclosión, ya sea por consumo de sangre infectada de mamíferos, por canibalismo o por coprofagia entre triatominos (Noireau *et al.*, 2009).

En Chile, estudios realizados en triatominos de Calera de Tango y Til-Til, Región Metropolitana, han detectado prevalencias de infección por *T. cruzi* mediante ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un 40,9% en *T. infestans* y 42,7% de *M. spinolai* (Bacigalupo *et al.*, 2006), similar al 36,5% encontrado en *T. infestans* de Putaendo, Región de Valparaíso (Bacigalupo *et al.*, 2010). Otro reporte en el cerro Lonquén, Región Metropolitana, muestra una prevalencia de infección de 68,6% en *T. infestans* domiciliarios y un 57,7% en los silvestres (Bacigalupo *et al.*, 2012). Por último, en cuanto a *M. gajardoi*, un estudio en dos playas del norte del país encontró una prevalencia de infección de 11,8% (Botto-Mahan *et al.*, 2008).

El agente infeccioso *T. cruzi* es un protista monoflagelado del orden Kinetoplastida, orden que se caracteriza por tener un organelo llamado kinetoplasto, el cual es un apéndice de una única mitocondria ubicada en la base del cuerpo del flagelo. Este contiene DNA

kinetoplastídico (DNAk), el cual se presenta como una red discal concatenada de maxicírculos (20-40 kb) y minicírculos (0,5-10 kb) (Lukes *et al.*, 2002). Los maxicírculos son copias idénticas que codifican para productos génicos típicos mitocondriales como RNA ribosomal (rRNA) y subunidades de la cadena respiratoria. Algunos de sus genes requieren modificaciones post-transcripcionales para decodificarse, y esta información genética es provista por RNA guías (gRNA) los cuales son codificados por los minicírculos (Lukes *et al.*, 2002). En *T. cruzi*, existen 20-25 copias de maxicírculos y alrededor de 20.000 copias de minicírculos según especie. Estos últimos se organizan en cuatro regiones conservadas (*Conserved Sequence Blocks*, CSB) separadas por cuatro regiones variables (Degraeve *et al.*, 1988). Debido al alto número de copias de los minicírculos y la existencia de regiones con secuencias conservadas, éstos se utilizan para el diagnóstico de la infección a través de PCR, utilizando partidores que se unen a las CSB (Ávila *et al.*, 1991). Al mismo tiempo, la amplificación del DNA de minicírculos genera un producto de la región variable, la cual es muy polimórfica y útil para la tipificación de *T. cruzi* a través de métodos de hibridación con sondas caracterizadas (Veas *et al.*, 1991).

Durante años se realizaron estudios de zimodemas –análisis de variantes electroforéticos de izoenzimas-, esquizodemas –polimorfismos de fragmentos de restricción de kDNA del minicírculo-, PCR de partidador único específico de bajo rigor (LSSP-PCR), análisis de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), polimorfismos del gen mini exón, polimorfismos del rDNA, cariotipificación y otras técnicas moleculares para finalmente identificar seis linajes de *T. cruzi* genéticamente relacionados entre sí e identificables por marcadores, llamados Unidades Discretas de Tipificación (DTU): TcI a TcVI (Zingales *et al.*, 2009).

En base a estudios filogenéticos se creó un modelo evolutivo de los diferentes linajes donde se sugiere que TcI y TcII son linajes ancestrales y los demás producto de hibridaciones entre estos linajes (Zingales *et al.*, 2009). En relación a los linajes ancestrales se postulaba que el linaje TcI era autóctono de Sudamérica (en coevolución con hospederos marsupiales), mientras que TcII era autóctono de Norteamérica (en coevolución con hospederos placentados) (Macedo *et al.*, 2004). Sin embargo, no parece existir un único grupo de hospederos asociado como se planteó originalmente, sino asociaciones más ligadas a la distribución geográfica (Guhl, 2013).

Actualmente existen dos modelos del origen de los DTUs híbridos de *T. cruzi*: “Modelo de dos hibridaciones” y “Modelo de los tres ancestros”. El primero postula una hibridación antigua entre TcI y TcII, que generó a TcIII y TcIV, seguido de una hibridación entre TcII y TcIII que generó a TcV y TcVI. El segundo modelo, en cambio, postula que TcI, TcII y TcIII son linajes ancestrales, y que dos intercambios genéticos recientes entre TcII y TcIII generaron a TcV y TcVI (Zingales *et al.*, 2012). Por lo tanto, ambos modelos involucran dos eventos de hibridación, pero se diferencian en si TcV y TcVI son producto de una única hibridación incorporando alelos de TcI adquiridos vía TcIII o progenie de dos hibridaciones excluyendo a TcI (Zingales *et al.*, 2012).

TcI es el linaje con mayor distribución, encontrándose desde el sur de EEUU hasta el centro de Argentina y Chile (Noireau *et al.*, 2009). TcII se encuentra principalmente en ciclos domésticos de la región sur y central de Sudamérica; TcIII desde EEUU al norte del Amazonas, principalmente ligado al ciclo silvestre en Brasil; TcIV posee una distribución similar a TcIII con excepción del Gran Chaco donde parece estar ausente; y por último TcV y TcVI se encuentra en Sudamérica central y del sur (Zingales *et al.*, 2012).

En Chile, en los estudios realizados, ha existido una infección preferencial de *T. infestans* y *M. spinolai* con el linaje TcI, el cual es el principal linaje circulante en el país tanto en el ciclo doméstico como silvestre (Coronado *et al.*, 2009; Bacigalupo *et al.*, 2012). Al ser TcI el linaje más frecuente en *M. spinolai*, es probable que sea el linaje más frecuente en animales silvestres, lo cual es consistente con un estudio realizado de Campos *et al.* (2007) donde TcI resultó ser el linaje más prevalente en los mamíferos estudiados. En el caso de *M. gajardoi*, un estudio observó que en ejemplares provenientes de zonas silvestres aisladas predominaba el linaje TcII, seguido del TcI y TcV, mientras que en zonas más periantrópicas predominó TcVI, seguido de TcI y TcII (Toledo *et al.*, 2013). Además, en *M. gajardoi* se observó una baja tasa de infecciones mixtas (Toledo *et al.*, 2013). En cambio, en *M. spinolai* las infecciones mixtas pueden alcanzar hasta un 50% (Coronado *et al.*, 2009).

La determinación de los linajes es importante debido a que se ha visto que las poblaciones de *T. cruzi* difieren en su habilidad de proliferar en el vector (Campos *et al.*, 2007). En un estudio realizado por Campos *et al.* (2007), se determinó que *M. spinolai* presenta mayor

susceptibilidad a la infección comparada con *T. infestans* además de una mayor capacidad de hospedar y reproducir diferentes linajes de *T. cruzi*. En general, existen diferencias en la capacidad vectorial de los triatomíneos, aumentando cuando éstos son de la misma zona que el parásito (Noireau *et al.*, 2009). En conclusión, el linaje TcI circula ampliamente en Chile, tanto en humanos como vectores de la zona central, sin embargo, los linajes TcII, TcV y TcVI también están presentes (Arenas *et al.*, 2012; Bacigalupo *et al.*, 2012; Coronado *et al.*, 2009).

El objetivo de identificar los linajes del *T. cruzi* es asociarlos con la clínica y patogénesis de la enfermedad, establecer los aspectos coevolutivos relacionados con reservorios y vectores, además de determinar el grado de resistencia a las drogas empleadas (Guhl, 2013). A pesar de que todos los linajes producen enfermedad en humanos, existen estudios que sugieren que la amplia variedad de cuadros clínicos de la enfermedad de Chagas se asocia a la alta variabilidad genética del protozoo, que mostraría preferencias de histotropismo (Cardinal *et al.*, 2008). En un estudio en humanos, el linaje de *T. cruzi* en sangre más frecuente fue el TcI mientras que el TcII y el TcVI fueron más frecuentes en corazón, cerebro y piel (Cardinal *et al.*, 2008). Por otra parte, en estudios en humanos y ratas con infecciones mixtas de dos linajes diferentes, estos demostraron tropismo diferencial durante la fase crónica (Andrade *et al.*, 1999; Vago *et al.*, 2000). Finalmente, la determinación del linaje es importante debido a que los linajes poseen diferentes grados de sensibilidad a los tratamientos, como se demostró en el estudio de Toledo *et al.*, (2003), donde TcI mostró resistencia al benznidazol y al itraconazol, mientras que TcII resultó más susceptible a ambas drogas.

En esta memoria de título se hará un análisis de los diferentes linajes de *T. cruzi* circulando en los vectores *T. infestans* y *M. spinolai* de distintas localidades del área endémica de Chile. Esto permitirá analizar las relaciones existentes entre linajes, especie vectora y localidad para así mejorar el conocimiento sobre la epidemiología de este agente en nuestro país y consecuentemente permitir un mejor control de la infección en el futuro.

OBJETIVO GENERAL

Comparar los linajes de *Trypanosoma cruzi* presentes en triatomíneos de seis localidades de la zona endémica ubicadas entre la Región de Coquimbo y Región Metropolitana de Chile.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar los linajes de *Trypanosoma cruzi* que infectan a vectores silvestres de la zona endémica de Chile.
2. Analizar la presentación de linajes de *Trypanosoma cruzi* en *Triatoma infestans* y *Mepraia spinolai*.
3. Analizar la presentación de los linajes en las diferentes localidades de captura del vector.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especímenes

Las muestras de este estudio correspondieron a ejemplares de *T. infestans* y *M. spinolai* confirmados como positivos a la infección por *T. cruzi* mediante PCR. Los ejemplares provenían de las localidades de: El Maqui (29°54'S-71°15'O) de la comuna de Monte Patria y Reserva Nacional las Chinchillas (31°28'S-71°03'O) de la comuna de Illapel, ambos de la Región de Coquimbo; El Sobrante (32°15'S-70°55'O) de la comuna de Petorca y Sahondé (32°37'S-70°43'O) de la comuna de Putaendo, ambos de la Región de Valparaíso; y El Atajo (33°4'S-70°55'O) de la comuna de Til-Til y La Batalla (32°47'S-71°11'O) de la comuna de Calera de Tango, ambos de la Región Metropolitana. Las condiciones climáticas y vegetación característica de cada localidad se detallan en la Tabla Nro. 1.

Tabla Nro. 1. Clima y vegetación característica por localidad

LOCALIDAD	CLIMA	VEGETACIÓN
El Maqui	Semiárido muy frío con lluvias invernales	Estepa alto-andina de la cordillera y estepa arbustiva de la precordillera de Coquimbo
R. N Las Chinchillas	Árido con nublados abundantes	Matorral estepario interior
El Sobrante	Templado frío con lluvias invernales	Matorral espinoso de la serranía
Sahondé	Templado frío con lluvias invernales	Matorral espinoso de la serranía
El Atajo	Templado cálido con lluvias invernales	Matorral espinoso de la serranía
La Batalla	Templado cálido con lluvias invernales	Matorral espinoso de la cordillera de la costa

Fuente: Gajardo, 1995; Rioseco y Tesser, 2012.

Todos los ejemplares fueron capturados durante el verano e invierno del año 2011, pero además, se obtuvieron ejemplares de Sahondé y de ambas localidades de la Región Metropolitana durante el verano del año 2012. Éstos fueron trasladados al Laboratorio de Ecología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Extracción de DNA y determinación de infección por PCR

Una vez muertos los ejemplares, los abdómenes de cada individuo se maceraron con Guanidina-HCl 6M - EDTA 200mM e incubaron con proteinasa K por tres horas a 54°C.

Posteriormente la extracción del DNA se realizó usando un kit comercial Quick-gDNA MiniPrep (Zymo Research ®). Se utilizaron 5 µl de eluido de cada muestra como molde de DNA, la cual se agregó a tubos individuales con *Master mix*, compuesto por solución buffer 1X; dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0,38mM; MgCl₂ 1,37 mM; 1,3 unidades de Paq DNA Polimerasa (Agilent ®); 0,4µM de cada oligonucleótido: 121 (5'-AAA TAA TGT ACG GGG GAG ATG CAT GA-3') y 122 (5'- GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3') que se unen a CSB2 y CSB3 del minicírculo respectivamente; y H₂O libre de nucleasas hasta completar un volumen de 32 µl. Cada prueba incluyó un control positivo y negativo con kDNA purificado de *T. cruzi* y agua libre de nucleasas, respectivamente.

La amplificación se realizó en un termociclador *Life Express Bioer Technology*® con un ciclo de 1 minuto a 98°C, un ciclo de 2 minutos a 64°C, seguidos de treinta y tres ciclos a 94°C por 1 minuto y 64°C por 1 minuto, y finalmente un ciclo a 72°C por 10 minutos. Posteriormente, 10 µl de los productos amplificados más 1,5 µl de buffer de carga, se cargaron en el gel de agarosa al 2% teñido con *Gel red* ®. Además, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (5 µl). Las muestras se dieron como positivas cuando al observar el gel con luz ultravioleta se evidenció la presencia de una banda de 330 pb, correspondiente al kDNA de *T. cruzi*. Un ejemplar se consideró positivo cuando al menos dos de tres resultados de la amplificación resultaron positivos.

De esta manera, se identificaron las muestras positivas utilizadas en este trabajo.

Genotipificación de *T. cruzi*

Se utilizaron un total 262 muestras de triatomíneos confirmados como positivos a la infección por *T. cruzi* según lo especificado anteriormente, de las cuales 112 correspondían a *M. spinolai* y 150 a *T. infestans*. Las muestras utilizadas provenían de La Reserva Nacional Las Chinchillas (n=20), El Maqui (n=7), El Sobrante (n=5), Sahondé (n=24), El Atajo (n=62) y La Batalla (n=143). Una de las muestras de *T. infestans* no poseía información sobre localidad de origen, por lo que sólo consideró en el análisis por especie. Estos resultados se muestran en la Tabla Nro. 2.

Tabla Nro. 2. Muestras genotipificadas según especie de triatomino, localidad de captura y estación del año.

LOCALIDAD	ESTACIÓN	ESPECIE DE TRIATOMINO		TOTAL
		<i>T. infestans</i>	<i>M. spinolai</i>	
Las Chinchillas	V2011	0	5	20
	I2011	0	15	
El Maqui	V2011	0	5	7
	I2011	0	2	
El Sobrante	V2011	0	1	5
	I2011	0	4	
Sahondé	V2011	5	4	24
	I2011	0	0	
	V2012	1	14	
El Atajo	V2011	0	25	62
	I2011	0	27	
	V2012	0	10	
La Batalla	V2011	139	0	143
	I2011	2	0	
	V2012	2	0	
TOTAL		149 (+1*)	112	262

* Muestra de localidad de origen desconocido

La genotipificación de *T. cruzi* se realizó mediante la técnica de DNA blot, cuya etapa inicial se realizó en el laboratorio de Ecología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Esta primera etapa consistió en realizar una transferencia del DNA desde un gel de agarosa a una membrana de nylon en la cual queda fijo. En este caso, se utilizaron geles de agarosa al 2% de cuatro filas, cargando en cada una un marcador de peso de 100 pb, seguido de 10 µl cada producto de PCR de las muestras a genotipificar en el mismo carril, quedando de esta forma un cuadruplicado de cada muestra por gel. Después de realizar una electroforesis a 100 Volts por 45 minutos, se puso el gel en un recipiente plástico sobre un agitador SK-D3309-Pro (SCI LOGEX®) y se cubrió en solución denaturante (NaCl 1,5M-NaOH 0,5M) realizando dos baños de 20 minutos, con lo cual el DNA del gel se reduce a mono-hebra. Luego, se hicieron cinco lavados con agua destilada, para posteriormente, en el mismo agitador, realizar dos baños de 20 minutos con

solución neutralizante (Tris 1,5M pH 7,4 – NaCl 1,5M).

El gel de agarosa luego se colocó sobre un papel filtro cuyas puntas quedan inmersas en solución citrato (SSC 2X: NaCl 0,3 M, citrato de sodio 0,03 M). Sobre el gel de agarosa se montó una membrana de nylon (Amersham Hybond™ -N⁺) rotulada con lápiz mina para localizar la posición de cada una de las muestras. La membrana se cubrió con un papel filtro y sobre éste se colocó una pila de servilletas con un peso sobre ellas. De esta manera, la solución citrato sube por capilaridad desde el papel filtro inferior, a través del gel, hasta impregnar la membrana, arrastrando el DNA. Después de una noche, se retiró la membrana y se introdujo en un Cross-linker Bio-Link BLX (Vilber Lourmat®), donde se expuso a luz UV (254nm) durante dos minutos para así fijar el DNA en la membrana.

La segunda etapa de la genotipificación consistió en transportar las membranas al Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, donde se realizó una hibridación de las membranas con sondas marcadas específicas para los diferentes linajes. Se utilizaron clones de *T. cruzi* (TcI: sp104cl1; TcII: CBBcl3; TcV: NRcl3; y TcVI: v195cl1) como moldes de DNA para generar sondas específicas marcadas con fósforo radioactivo según lo especificado por Veas *et al.* (1991). Estas sondas generadas por PCR con los oligonucleótidos CV1 y CV2 (aproximadamente 250 pb) no contienen la región constante que hibrida con minicírculos de otros linajes. Se consideraron como control positivo otras membranas de diferentes orígenes, pero sometidas al mismo procedimiento, en las cuales aparecía al menos un resultado de hibridación positiva. Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas. Las membranas se pre-hibridaron por 4 horas a 55°C en SSC 2X, para luego realizar la hibridación en condiciones de alta rigurosidad: 55°C en SSC 2X y lavado a 55°C en SSC 0,1X. Después de una noche de hibridación, cada membrana se lavó tres veces por 30 minutos con SSC 2X y 0,1% dodecil sulfato de sodio a 55°C. Los resultados se analizaron en un autorradiógrafo *Molecular Imager FX* (Bio-rad®).

Análisis Estadístico

Se determinó si existían diferencias en la proporción de infección entre especies, así como la proporción de infección entre localidades utilizando la prueba exacta de Fisher.

Con el fin de determinar la diversidad de linajes por especie y por localidad se calculó el

promedio del índice de biodiversidad Shannon-Weaver (H) mediante el software PAST, con un *bootstrap* de 9.999 permutaciones aleatorias (95% confianza). Para aplicar el índice en cada especie, se consideró a cada linaje como una especie dentro de una comunidad (el triatomino). Se consideró para *M. spinolai* un n=61, y para *T. infestans* un n=118, y en el análisis por localidad se consideró para El Maqui un n=2, para la Reserva Nacional Las Chinchillas n=14, El Sobrante n=3, Sahondé n=4, El Atajo n=40 y La Batalla n=118.

Los resultados del promedio del índice por especie de triatominos se compararon usando T-Student, mientras que los resultados del índice por localidad se compararon utilizando la prueba de Tukey's *Honest Significant Difference* (HSD), la cual compara de a pares de localidades en todas las combinaciones posibles.

RESULTADOS

Se transfirieron un total de 262 muestras, de las cuales 33 no fueron correctamente transferidas puesto que no hubo control positivo efectivo, por lo que no se consideraron en el análisis. Estas muestras, provenían de ambas especies y sólo de las localidades de Sahondé, el Atajo y La Batalla, como lo muestra la Tabla Nro. 3.

TABLA Nro. 3: Muestras no incluidas en el análisis

	<i>T. infestans</i>	<i>M. spinolai</i>	
El Maqui	0	0	0
R.N Las Chinchillas	0	0	0
El Sobrante	0	0	0
Sahondé	1	6	7
El Atajo	0	6	6
La Batalla	20	0	20
	21	12	33

De las 229 muestras consideradas, 129 correspondían a *T. infestans* (56,3%) y 100 a *M. spinolai* (43,7%). A su vez, dentro de las 229 muestras consideradas, sólo 114 hibridaron con, al menos una sonda (49,8%) de las cuales 65 correspondían a *T. infestans* (57%) y 49 a *M. spinolai* (43%). Por lo tanto, 115 muestras (50,2%) no hibridaron con ninguna sonda, a pesar de provenir de membranas con control positivo efectivo. Los resultados por especie de triatomino y por localidad de captura se muestran en las Tablas Nro.4 y Nro. 5, respectivamente.

TABLA Nro.4: Hibridación de muestras efectivamente transferidas según especie de triatomino.

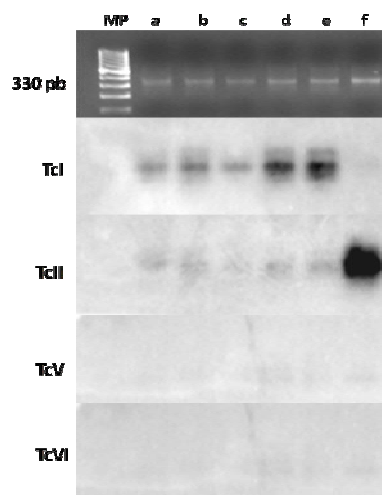
	<i>T. infestans</i>	<i>M. spinolai</i>	Total
Hibridó	65	49	114
No hibridó	64	51	115
Total	129	100	229

TABLA Nro.5: Hibridación de muestras efectivamente transferidas según localidad de captura del triatomino.

	El Maqui	R.N Las Chinchillas	El Sobrante	Sahondé	El Atajo	La Batalla	Total
Hibridó	2	12	2	3	31	64	114
No hibridó	5	8	3	14	25	59	114*
Total	7	20	5	17	56	123	228
* No se consideró una muestra debido a que no existía información de localidad							

Cabe destacar que cuando una muestra hibridó con dos o más sondas, se consideró como una infección mixta. En la Figura Nro. 1 se observa un ejemplo de membranas con infección única (f) e infecciones mixtas (a, b, c, d, e).

FIGURA Nro. 1. Membranas exhibiendo muestras con infecciones únicas y mixtas.



En cuanto a la identificación de linajes de *T. cruzi*, en ambas especies, el linaje más abundante, tanto en infecciones mixtas como simples, fue TcI (79,6% en *M. spinolai* y 81,5% en *T. infestans*), seguido, en el caso de *M. spinolai* de TcII (34,7%) y TcVI (10,2%), sin haber ninguna hibridación con el linaje TcV en las muestras obtenidas de esta especie. En *T. infestans*, en cambio, luego de TcI los linajes más abundantes fueron TcII (40%), seguido de TcV (36,9%) y TcVI (23%). Los resultados se muestran en la Tabla Nro.6.

TABLA Nro.6: Linajes en infecciones únicas y mixtas por especie de triatomino.

Espece	N	TcI	TcII	TcV	TcVI
<i>M. spinolai</i>	49 37*, 12**	39 27*, 12**	17 10*, 7**	0 0*, 0**	5 0*, 5**
<i>T. infestans</i>	65 37*, 28**	53 27*, 26**	26 6*, 20**	24 4*, 20**	15 0*, 15**
Total	114 (74*, 40**)	92 (54*, 38**)	43 (16*, 27**)	24 (4*, 20**)	20 (0*, 20**)
* Infecciones únicas, ** Infecciones Mixtas					

En cuanto a la composición genotípica por especie, en *T. infestans* se observó una gran proporción de infecciones mixtas (43%). En esta última especie se pudieron identificar infecciones dobles por TcI-TcII, TcI-TcV, TcI-TcVI y TcII-TcV; infecciones triples por TcI-TcII-TcV y TcI-TcV-TcVI; e incluso infecciones cuádruples con todos los linajes testeados. En general, dentro del total de infecciones mixtas de *T. infestans* (28) el linaje TcI fue el más abundante, presente en el 92,9% de las infecciones, seguido de los linajes TcII y TcV (71,4% cada uno) y luego por TcVI (53,6%). En el caso *M. spinolai*, sólo se encontraron infecciones mixtas dobles (12), compuestas por los linajes TcI-TcII y TcI-TcVI, estando TcI por lo tanto en el 100% de ellas, y TcII y TcVI representadas en 58,3% y 41,7%, respectivamente.

Al comparar la proporción de los diferentes linajes entre especies de triatominos, el único linaje que mostró diferencias significativas entre ambas fue TcV (Prueba exacta de Fisher, $P < 0,0001$), existiendo una mayor proporción en *T. infestans*, dado que no se encontraron infecciones por este linaje en *M. spinolai*. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de los otros linajes según especie de triatomino (Prueba exacta de Fisher, TcI $P = 0,787$; TcII $P = 0,611$; TcVI $P = 0,99$). El linaje TcVI se encontró en ambas especies, pero sólo formando parte de infecciones mixtas y siempre asociado a TcI.

Al comparar la proporción de infecciones mixtas entre ambas especies, sólo se encontraron diferencias significativas en las infecciones cuádruples, habiendo una mayor proporción en *T. infestans* con respecto a *M. spinolai* (Prueba exacta de Fisher: infecciones dobles $P =$

0,674; infecciones triples P=0,07; infecciones cuádruples P=0,006).

En el índice de Shannon Weaver H' promedio por especie de triatomo, se obtuvo para *M. spinolai* H' = 0,8471 (Rango=0,992-1,306) y para *T. infestans* un H' = 1,279 (Rango= 1,069-1,284). Los valores promedio de H' por especie fueron significativamente diferentes (t=-4,757, df=97,978, P=6,7685E-06), encontrándose una mayor diversidad de linajes en *T. infestans*.

En relación al análisis por localidad de captura del vector, también se pudo observar que TcI fue el linaje más abundante en la mayoría de las localidades estudiadas (TcI: 50% en el Maqui, 75% en la Reserva Nacional Las Chinchillas, 50% en el Sobrante, 66,7% en Sahondé, 87% en El Atajo y 81,3% en La Batalla). Además, se pudo observar que se encontraron los linajes TcI y TcII en todas las localidades, mientras que TcV sólo se encontró en la localidad de La Batalla. TcVI se encontró en la Reserva Nacional Las Chinchillas, Sahondé, El Atajo y La Batalla. Los resultados se muestran en la Tabla Nro. 7.

TABLA Nro.7: Linajes de infecciones únicas y mixtas por localidad de captura del vector.

Localidad	N	TcI	TcII	TcV	TcVI
El Maqui	2 2*, 0**	1 1*, 0**	1 1*, 0**	0	0
R.N Las Chinchillas	12 10*, 2**	9 7*, 2**	4 3*, 1**	0	1 0*, 1**
El Sobrante	2 1*, 1**	1 0*, 1**	2 1*, 1**	0	0
Sahondé	3 2*, 1**	2 1*, 1**	1 1*, 0**	0	1 0*, 1**
El Atajo	31 22*, 9**	27 18*, 9**	9 4*, 5**	0	4 0*, 4**
La Batalla	64 37*, 27**	52 27*, 25**	26 6*, 20**	24 4*, 20**	14 0*, 14**
Total	114	92 (54*, 38**)	43 (16*, 27**)	24 (4*, 20**)	20 (0*, 20**)

Debido a que el linaje TcV se observó exclusivamente en la localidad de La Batalla, se encontró una diferencia altamente significativa (Prueba exacta de Fisher, $P < 0,0001$) en la proporción de este linaje en esa localidad con respecto a las otras. El análisis comparativo de los otros linajes según localidad no arrojó diferencias significativas (Prueba exacta de Fisher, TcI $P = 0,055$; TcII $P = 0,496$; TcVI $P = 0,920$). Tampoco se encontró diferencias en la proporción de infecciones mixtas de ningún tipo entre localidades de captura (Dobles $P = 0,638$; Triples $P = 0,627$; Cuádruples $P = 0,170$; Mixta $P = 0,412$).

El índice de Shannon Weaver H' promedio según localidad resultó para El Maqui de $H' = 0,6931$ (Rango= 0-0,6931); para la Reserva Nacional Las Chinchillas de $H' = 0,8305$ (Rango= 0,1656-1,334); El Sobrante de $H' = 0,6365$ (Rango= 0-1,099); Sahondé de $H' = 1,04$ (Rango= 0-1,386); El Atajo $H' = 0,8312$ (Rango= 0,9597-1,319) y La Batalla $H' = 1,281$ (Rango= 1,074-1,289). Al realizar la prueba de Tukey HSD para comparar los valores promedios del índice H' entre localidades, no se obtuvieron diferencias significativas en ninguna de las combinaciones de a pares, como se observa en la Tabla Nro. 8.

TABLA Nro. 8. Resultados de la prueba de Tukey HSD comparando índices de diversidad de Shannon Weaver (H') entre pares de localidades.

LOCALIDAD	El Maqui	R. N Las Chinchillas	El Sobrante	Sahondé	El Atajo	La Batalla
El Maqui		0,7716	0,9994	0,9239	0,6241	0,3613
R.N Las Chinchillas	1,861		0,9108	0,999	0,9998	0,9701
El Sobrante	0,4533	1,408		0,986	0,7996	0,5274
Sahondé	1,349	0,5119	0,896		0,9866	0,8651
El Atajo	2,237	0,3755	1,783	0,8875		0,9957
La Batalla	2,93	1,069	2,477	1,581	0,6931	

Además, se realizó la prueba exacta de Fisher para analizar las diferencias de proporción de linajes según estación del año, considerando exclusivamente las muestras tomadas durante invierno y verano del año 2011 para estos efectos. Cabe destacar que se encontraron diferencias significativas en la proporción de los linajes TcI, TcV y TcVI (Prueba exacta de

Fisher, $P=0,013$, $P=0,002$ y $P=0,026$ respectivamente), encontrándose en todos los casos una mayor proporción durante el verano por sobre el invierno. En el caso del linaje TcII, este no presentó diferencias según estación del año (Prueba exacta de Fisher, $P=0,229$).

Considerando que durante el período del año 2011, sólo se encontraron infecciones mixtas dobles (TcI-TcII, TcI-TcV, TcI-TcVI), se analizó la proporción de los tipos de infecciones dobles en cada estación del año y se encontró una diferencia significativa en la proporción de TcI-TcII siendo esta mayor durante el verano (Prueba exacta de Fisher, $P=0,002$). No hubo diferencia en los otros tipos de infecciones dobles (Prueba exacta de Fisher, TcI-TcV $P=0,576$; TcI-TcVI $P=0,592$).

Por último, en relación a la composición de linajes dentro de cada especie según estación, se encontró que en *M. spinolai* existía una proporción significativamente mayor del linaje TcI durante el verano que sobre el invierno (Prueba exacta de Fisher, $P=0,002$) y dentro de *T. infestans* se encontró una proporción mayor de infección TcI-TcII, durante el verano por sobre la misma especie durante el invierno (Prueba exacta de Fisher, $P=0,047$).

DISCUSIÓN

Los resultados globales de este estudio concuerdan con los descritos anteriormente en triatomos del ciclo silvestre de la enfermedad de Chagas en Chile, donde se evidencia la presencia de los linajes TcI, TcII, TcV y TcVI, con predominio general de TcI (Torres *et al.*, 2004; Coronado *et al.*, 2009; Arenas *et al.*, 2012; Bacigalupo *et al.*, 2012). En este estudio, el linaje TcI también predominó en ambas especies de triatomos silvestres estudiadas tanto en infecciones únicas como mixtas. Este predominio de TcI conlleva a que este sería el linaje con mayor probabilidad de transmisión a los hospederos silvestres en Chile, lo cual coincide con lo encontrado en estudios de mamíferos silvestres de la zona central, donde se encuentra una frecuencia variable de los linajes mencionados, siendo generalmente TcI y TcII los más representados (Campos *et al.*, 2007; Galuppo *et al.*, 2009; Rozas *et al.*, 2007).

Al considerarse interrumpida la transmisión vectorial en humanos desde el año 1999 en Chile, mediante el control de los focos domésticos de *T. infestans* (Lorca *et al.*, 2001), el principal riesgo de infección vectorial actual estaría constituido por la aparición esporádica de triatomos provenientes de focos silvestres en los domicilios. Por lo anterior, el predominio de TcI en ambas especies analizadas en este estudio implicaría que en Chile las personas también tendrían mayor probabilidad de infección con este linaje, lo cual se condice con lo reportado por el estudio de Coronado *et al.*, 2006. Esto conlleva serias implicancias, ya que este linaje está asociado en humanos a cardiomiopatías severas y meningoencefalopatías en caso de presentar SIDA de forma concurrente; el linaje TcI también se describe con una mayor resistencia a drogas (Toledo *et al.*, 2003; Zingales *et al.*, 2012; Cura y Schijman, 2013).

Esta mayor proporción de TcI en los vectores estudiados puede deberse realmente a una mayor proporción de este linaje en la naturaleza o a que esté distribuido de tal forma que se favorezca su diagnóstico. En un estudio realizado en humanos se observó que TcI tiene una mayor tendencia a encontrarse en sangre con respecto a otros linajes (Coronado *et al.*, 2006), lo cual podría suponerse que derivaría en una mayor infección de los triatomos con este linaje. Además, la mayor proporción de TcI en *T. infestans* es concordante con datos reportados respecto a la eficiencia de transmisión de los linajes de *T. cruzi* en

condiciones experimentales, la cual es mayor para TcI, seguido de TcV y finalmente de TcII (De Lana *et al.*, 1998). Sin embargo, en este estudio se encontró una mayor proporción de TcII respecto a TcV, lo que podría indicar un proceso de adaptación de los *T. infestans* locales al linaje TcII, el cual es frecuente en mamíferos silvestres y personas del país (Rozas *et al.*, 2007; Coronado *et al.*, 2006).

El linaje TcV se encuentra asociado en humanos a megasíndromes, junto con los linaje TcII y TcVI (Zingales *et al.*, 2012). Esto explicaría la baja tasa de casos con megasíndrome en el norte de Sudamérica, donde los linajes TcV y TcVI son raros (Zingales *et al.*, 2012; Macedo *et al.*, 2004). En Chile el linaje TcV se ha encontrado abundantemente en poblaciones de *M. spinolai* (Campos *et al.*, 2007; Coronado *et al.*, 2009); sin embargo, en este estudio sorprendió que *M. spinolai* no presentó infección por este linaje, a diferencia de *T. infestans*, particularmente de la localidad de Calera de Tango. Por lo tanto, en base a lo encontrado en este estudio podría suponerse que la infección de personas a través de *T. infestans* implicaría un mayor riesgo de infección con el linaje TcV, lo cual a su vez conllevaría una mayor probabilidad de desarrollar un megasíndrome.

El linaje TcV se encuentra principalmente descrito en el ciclo doméstico de países del cono sur (Zingales *et al.*, 2012), habiendo diversos estudios que han demostrado su predominio en aislados humanos de zonas de Argentina y Bolivia, donde *T. infestans* es un vector importante (Breniere *et al.*, 2002; Diosque *et al.*, 2003; Cardinal *et al.*, 2008). Considerando el reciente hallazgo de *T. infestans* en focos silvestres en Chile (Bacigalupo *et al.*, 2006; Bacigalupo *et al.*, 2010), se han planteado varias hipótesis sobre el origen de estas poblaciones. Utilizando secuencias de genes mitocondriales y herramientas de biogeografía histórica, se respaldó una doble ruta de dispersión de *T. infestans* hacia Chile; por el norte desde Bolivia-Perú, y desde el sureste (Argentina), sin distinción de poblaciones domésticas o silvestres (Torres-Pérez *et al.*, 2011). Esta posible proveniencia de otras zonas del cono sur donde TcV es altamente prevalente, podría explicar la presencia de estos linajes en *T. infestans* de Chile. A esto se suma que se ha detectado una mayor proporción de infección con el linaje TcV en animales peridomésticos en Chile (Rozas *et al.*, 2007). Considerando lo expuesto, podría plantearse que debido a la presencia de alas en los adultos de ambos sexos de *T. infestans* -a diferencia de *M. spinolai* cuyas hembras adultas carecen de alas y los machos pueden o no tenerlas-, éstos tienen mayor probabilidad

de acercarse a ambientes domésticos y peridomésticos atraídos por la luz, lo cual podría generar la adquisición de este genotipo en mayor frecuencia por parte de los mamíferos presentes en esos sectores. Esto se respalda por el hecho de que *T. infestans* puede desplazarse distancias de al menos 1,5 km (Schweigmann *et al.*, 1988), y que en un estudio realizado en Chile existen datos de captura de ejemplares silvestres de *T. infestans* a una distancia promedio de asentamientos humanos de 600m, con un rango de 159 m a 1053 m (Bacigalupo *et al.*, 2010).

Otra hipótesis del predominio de TcV en *T. infestans*, es que el linaje tenga mayor afinidad con alguna especie hospedera que a su vez sea preferida por *T. infestans*, resultando por lo tanto en una mayor prevalencia de este linaje en esa especie vectora. Considerando, por ejemplo, que *Octodon degus*, importante reservorio en Chile, tiene hábitos diurnos al igual que *M. spinolai*, éste podría tener menor probabilidad de ser picado por esta especie que por *T. infestans*, la cual es nocturna, lo que coincidiría con el periodo de reposo de *O. degus*. Esto es importante puesto que en un estudio que analizó los linajes de micro-mamíferos capturados en Calera de Tango, se observó una mayor proporción de infección por el linaje TcV en *O. degus* (Galuppo *et al.*, 2009), lo cual podría explicar esta mayor proporción de dicho linaje en *T. infestans* que cohabitan en esa localidad. Para confirmar esta hipótesis habría que analizar el perfil alimentario de las poblaciones silvestres de *T. infestans* provenientes de la localidad de Calera de Tango.

En este trabajo también se encontró al linaje TcVI exclusivamente en infecciones mixtas y siempre asociado al linaje TcI. A pesar de que en otros estudios se han encontrado infecciones aisladas por TcVI o en asociación a otros linajes (aunque en baja proporción) (Coronado *et al.*, 2009), su asociación estricta al linaje TcI se ha observado en otros estudios en triatomíneos (Bacigalupo *et al.*, 2012) y micro-mamíferos (Campos *et al.*, 2007; Rozas *et al.*, 2007). Se han documentado interacciones entre linajes dentro de los vectores, evidenciándose posibles sinergismos o inhibiciones entre ellos (Pinto *et al.*, 1998; González *et al.*, 2009). Por lo anterior, en este caso la asociación entre TcI y TcVI podría ser resultado de un comensalismo entre ambos linajes, con el linaje TcVI favoreciéndose por la presencia de TcI.

En estudios anteriores también se había observado que *M. spinolai* presentaba una mayor

susceptibilidad de infección que *T. infestans*, lo cual derivaba en una mayor proporción de los diferentes linajes y mayor presentación de infecciones mixtas (Campos *et al.*, 2007; Coronado *et al.*, 2009; Toledo *et al.*, 2013), respaldando la hipótesis de que *T. infestans* estaría menos adaptado que *M. spinolai* para transmitir linajes de *T. cruzi* locales, considerando la reciente colonización de *T. infestans* en Chile (Campos *et al.*, 2007). En este caso, sin embargo, sorprendió encontrar lo contrario, presentando *T. infestans* más infecciones mixtas dobles, triples e incluso cuádruples. Este predominio de infecciones mixtas en *T. infestans* sobre *M. spinolai* no se había evidenciado anteriormente.

Se ha propuesto que el estadio de los triatomíneos podría influir en la composición genotípica y en la proporción de infecciones mixtas encontradas. En un estudio realizado por Bacigalupo *et al.*, (2012), se encontró una diferencia significativa en la proporción de infecciones únicas y mixtas entre ninfas y adultos. Por lo tanto, una composición etaria diferente entre los *T. infestans* y *M. spinolai* testeados en este estudio podría explicar la mayor proporción de infecciones mixtas en *T. infestans*. En este caso no se realizó un análisis según el estadio de los triatomíneos debido a que se desconocía dicha información de una gran proporción de las muestras.

El descubrimiento de una mayor diversidad de linajes y proporción de infecciones mixtas en *T. infestans* puede ser interesante considerando la mayor probabilidad de transmisión de *T. cruzi* a humanos por parte de *T. infestans*, debido a su frecuencia de aparición en viviendas humanas atraído por la luz (Bacigalupo *et al.*, 2006; Bacigalupo *et al.*, 2010), y a su mayor eficiencia de transmisión debido a una tasa de defecación más rápida post ingesta de sangre que *M. spinolai* (Canals *et al.*, 1998). Además, se ha propuesto que la existencia de infecciones mixtas puede tener una gran relevancia biológica, al generar interacciones entre linajes como competencia y estimulación, tanto dentro de hospederos vertebrados como de vectores invertebrados (Pinto *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 1998). En *T. infestans* se ha evidenciado la eliminación de algunos linajes de *T. cruzi* de infecciones mixtas dobles experimentales, sugiriendo su rol como filtro biológico (Pinto *et al.*, 2000).

Con respecto al tipo de infecciones mixtas, se pudo observar que TcI estuvo presente en la mayoría de las combinaciones en ambas especies, lo cual concuerda con estudios anteriores en triatomíneos chilenos (Campos *et al.*, 2007; Coronado *et al.*, 2009; Bacigalupo *et al.*,

2012), y con estudios *in vivo* e *in vitro* en la especie *Triatoma brasiliensis* donde TcI muestra selección positiva en co-cultivo con otros linajes (Araujo *et al.*, 2007). Al comparar los índices de diversidad de Shannon Weaver H' con los obtenidos en otros trabajos realizados en algunas de las localidades estudiadas, se puede observar que en este caso tanto *T. infestans* como *M. spinolai* obtuvieron índices mayores (Bacigalupo *et al.*, 2012; Coronado *et al.*, 2009), indicando un aumento de diversidad de linajes en el tiempo.

Existe evidencia que respalda el rol selectivo de linajes por parte de los triatominos (Schaub y Losch, 1989; Sanchez *et al.*, 1990; Coronado *et al.*, 2006; Campo *et al.*, 2007). Se ha demostrado que el desarrollo de las diferentes poblaciones de *T. cruzi* está mediado por interacciones entre linajes, así como por diferentes grados de sensibilidad a diversos factores del vector como; simbioses del tracto intestinal propios de cada triatomo, péptidos hemolíticos, lectinas y el sistema endocrino del insecto, entre otros (García *et al.*, 2007; Vallejo *et al.*, 2009). Por lo tanto, estas diferencias fisiológicas de los triatominos podrían explicar la variabilidad en la proporción de los diferentes linajes por especie.

En cuanto a las localidades estudiadas, TcI también resultó el linaje predominante, excepto en El Sobrante y El Maqui donde, sin embargo, el número de muestras era muy bajo. En un estudio anterior realizado por Coronado *et al.* (2009) en la Reserva Nacional Las Chinchillas, también se encontró un predominio de TcI en dos poblaciones de *M. spinolai* estudiadas (proporción de 59,8% y 52,1% respectivamente). En este estudio se observa un 45% de infección por el linaje TcI en los ejemplares de *M. spinolai* de esa localidad, mostrando una leve disminución de la proporción de TcI en esta especie y localidad. Además, en el mismo estudio citado anteriormente, se encontró luego de TcI, una mayor proporción de TcII, TcV y finalmente TcVI, lo cual difiere de este estudio, donde no se detectó hibridación de los ejemplares de esta zona con el linaje TcV. En el estudio realizado por Bacigalupo *et al.* (2012) en *T. infestans* de Calera de Tango, se encontró que TcI se encontraba en un 93,3% de los *T. infestans* silvestres capturados, lo cual es altamente mayor a lo encontrado en los ejemplares de *T. infestans* de esa misma localidad en este estudio (42,3%). También es importante destacar que no existe documentación previa de los linajes de *T. cruzi* en las localidades de El Maqui, El Sobrante y El Atajo.

Finalmente, con respecto al análisis por localidad, cabe destacar que la presencia del linaje

TcV en este estudio se encontró exclusivamente en la localidad de Calera de Tango. Se conoce que existen tendencias de asociación de linajes con diferentes zonas geográficas; sin embargo, estas asociaciones no suelen ser definitivas (Zingales *et al.* 2012), y se han opacado por cambios masivos de migraciones de mamíferos entre las Américas, cambios de hábitat mediados por el clima, por la destrucción de ellos por causas naturales y antrópicas y por la urbanización realizada por la población humana (Zingales *et al.*, 2012). Además, dado que existen estudios anteriores de triatominos donde se ha detectado el linaje TcV en localidades de la Región de Valparaíso y de la Región Metropolitana (Segovia, 2010), podría descartarse que el linaje TcV tenga una asociación estricta con la localidad de Calera de Tango.

Es destacable además que en este trabajo se encontró una diferencia significativa en la proporción de todos los linajes, con excepción de TcII entre estaciones del año, además de un cambio significativo en la proporción de infecciones dobles de TcI-TcII. En todos los casos se observó una mayor proporción durante el verano. Variaciones temporales de densidad e infección en vectores y hospederos han sido anteriormente documentadas (Bacigalupo *et al.*, 2010; Botto-Mahan *et al.*, 2010; Ceballos *et al.*, 2005). Además se ha comprobado cómo la reproducción, ciclo, y sobrevivencia de los vectores se afecta con la temperatura y humedad (Canals *et al.*, 1998; Carcavallo, 1999). Al existir variación de la densidad y proporción de diferentes especies de hospederos, también podría haber diferente proporción de linajes debido a la variabilidad de afinidad entre linajes y especies hospederas. Además, al afectarse la disponibilidad de alimento para los triatominos, se afecta también su estado nutricional. Ha sido probado que durante periodos largos de desnutrición, el 99,5% de los *T. cruzi* del recto de los triatominos pueden morir, sometiendo a las poblaciones de *T. cruzi* a constante selección (Kollien y Schaub, 2000). Además se ha visto que las altas temperaturas podrían ampliar la distribución geográfica de los vectores silvestres (Carcavallo, 1999) lo cual podría derivar en su exposición a una mayor variedad de linajes. Todo lo anterior podría resultar en el predominio de uno u otro linaje en diferentes estaciones del año, siendo posible considerar que existiría una mayor cantidad de linajes durante el verano, cuando hay mayor cantidad de hospederos y mejor estado nutricional de los vectores.

Por último, es importante comentar el alto número de muestras que no hibridaron con ninguna de las sondas utilizadas (50,2%). Esto pudo haber ocurrido por varias razones. Primero, no se puede descartar que algunas de las muestras que no hibridaron correspondan a los linajes TcIII y/o TcIV, ya que en un estudio realizado por Venegas *et al.*, (2011) se detectó la presencia del linaje TcIII en *T. infestans* de Chile, sin embargo, dichos resultados se obtuvieron utilizando tres marcadores microsatélites, y no se ha vuelto a detectar en otros análisis como el realizado por Arenas *et al.*, (2012) donde se pesquisó una gran cantidad de muestras humanas y de vectores chilenos mediante diversas técnicas moleculares. Además, estos linajes son descritos generalmente en áreas reducidas del Amazonas y el norte de Sudamérica (Zingales *et al.*, 2012). Podría ocurrir también que los linajes desconocidos sean ligeramente diferentes a los utilizados como sondas en esta oportunidad, y que por lo tanto no hayan hibridado con ninguna de las sondas a pesar de ser del mismo DTU. Esto ha sido reportado en otras áreas endémicas, donde *T. cruzi* genéticamente relacionados, exhiben ausencia de hibridación entre DNA de minicírculos (Bosseno *et al.*, 2000). Por último, debido a la complejidad del método y el alto número de procedimientos realizados, no se puede descartar alguna falla técnica que haya llevado a una deficiente transferencia y adherencia del DNA de las muestras a la membrana de Nylon. Para mejorar la baja tasa de hibridación, se recomendaría repetir el procedimiento de estas muestras e incluir en la hibridación sondas para los linajes TcIII y TcIV, y así poder determinar fehacientemente la causa por la cual se obtuvieron estos resultados.

Este estudio analizó los linajes de una gran cantidad de muestras provenientes de la zona endémica de Chile, incluyendo datos de las localidades de El Maqui, El Sobrante y El Atajo, las cuales no habían sido analizadas previamente. Se confirmó que los linajes de *Trypanosoma cruzi* TcI, TcII, TcV y TcVI circulan ampliamente en triatomos silvestres de la zona endémica de Chile, con un claro predominio general de TcI tanto por localidad como por especie. Por primera vez, este estudio detectó una mayor diversidad de linajes y mayor presencia de infecciones mixtas en la especie *T. infestans* respecto a *M. spinolai*. Además, se detectó una asociación particular entre el linaje TcV y *T. infestans* de la localidad de Calera de Tango, lo cual podría estar relacionado a la cercanía de esa especie a ambientes domésticos, donde TcV es más frecuente, o a alguna asociación de *T. infestans* con el reservorio *O. degus* el cual tiene una alta proporción de TcV en esa localidad. Por

último, se observó una evidente diferencia en la proporción de algunos linajes según la estación del año (verano/invierno), lo cual podría relacionarse con la variación de disponibilidad de hospederos, con el estado nutricional del vector y la selección de subpoblaciones de *T. cruzi* durante este proceso, por lo que durante el verano existiría una mayor proporción de infección y mayor diversidad de genotipos circulantes.

CONCLUSIONES

- Se detectaron los linajes TcI, TcII, TcV y TcVI, predominando el linaje TcI en ambas especies de triatomíneos. En *Triatoma infestans* el orden de predominancia de linajes en forma decreciente fue TcI, TcII, TcV y TcVI. En *M. spinolai*, en cambio, predominó TcI, seguid de TcII y luego TcVI, ya que no se detectó la presencia de TcV.
- Se encontró una diferencia significativa en la proporción del linaje TcV y de infecciones cuádruples entre especies de triatomíneos, siendo mayores en *T. infestans* sobre *M. spinolai*. Además, se encontró una mayor cantidad y tipos de infecciones mixtas en *T. infestans*, así como un índice de diversidad de Shannon Weaver H' significativamente mayor.
- En el análisis por localidad sólo se encontró diferencia significativa en la proporción de TcV, el cual se detectó exclusivamente en la localidad de Calera de Tango en ejemplares de *T. infestans*. No existirían diferencias entre localidades respecto al índice H' .
- Existió una predominancia significativa de todos los linajes estudiados durante el verano, con excepción de TcII.

BIBLIOGRAFÍA

- **ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J.; MACEDO, A.M.** 1999. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol*, 100:163–172
- **ARAÚJO, C.; CABELLO, P.; JANSEN, A.M.** 2007. Growth behaviour of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: in vitro and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis*. *Acta Trop* 101: 225–231.
- **APT, W.; HEITMANN, I.; JERECIC, M.I.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; NOEMÍ, I.; SAN MARTÓN, A.M.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I.** 2008. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. Parte I: Introducción y epidemiología. *Rev Chil Infect.* 25(3): 190-193.
- **ARENAS, M.; CAMPOS, R.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.** 2012. *Trypanosoma cruzi* genotypes of insect vectors and patients with Chagas of Chile studied by means of Cytochrome b Gene Sequencing, Minicircle Hybridization, and Nuclear Gene Polymorphisms. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12 (3): 196-205
- **ÁVILA, H.A.; SIGMAN, D.S.; COHEN, L.M.; MILLIKAN, R.C; SIMPSON, L.** 1991. PCR amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasit.* 48: 211-222.
- **BACIGALUPO, A.; SEGURA, J.A.; GARCIA, A.; HIDALGO, J.; GALUPPO, S.; CATTAN, P.E.** 2006. Primer hallazgo de vectores de la enfermedad de Chagas asociados a matorrales silvestres en la Región Metropolitana, Chile. *Rev Méd Chile* 134: 1230-1236.
- **BACIGALUPO, A.; TORRES-PEREZ, F.; SEGOVIA, V.; GARCÍA, A.; CORREA, J.P.; MORENO, L.; ARROYO, P.; CATTAN, P.E.** 2010. Sylvatic foci of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Chile: description of a new focus and challenges for control programs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(5): 633-641
- **BACIGALUPO, A.; SEGOVIA, V.; GARCÍA, A.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.; ACUNA-RETAMAR, M.; TORRES-PEREZ, F.; CATTAN, P.E.** 2012. Differential Pattern of Infection of Sylvatic Nymphs and Domiciliary Adults of *Triatoma infestans* with *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Chile. *Am J Trop Med Hyg* 87(3):473–480.
- **BOSENSO, M.F.; ESPINOZA, B.; SANCHEZ, B.; BRENIERE, SF.** 2000. Mexican *Trypanosoma cruzi* stocks: analysis of minicircles kDNA homologies by cross-hybridization. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:473–476.
- **BOTTO-MAHAN, C.; SEPULVEDA, M.; VIDAL, M.; ACUÑA-RETAMAR, M.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.** 2008. *Trypanosoma cruzi* infection in the sylvatic kissing bug *Mepraia gajardoi* from the Chilean Southern Pacific Ocean coast. *Acta Trop* 105:166–169.

- **BOTTO-MAHAN, C.; CAMPOS, R.; ACUÑA-RETAMAR, M.; CORONADO, X.; CATTAN, P.E.; SOLARI, A.** 2010. Temporal Variation of *Trypanosoma cruzi* Infection in Native Mammals in Chile. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(3): 317-319
- **BRENIÉRE, S.F.; BOSSENO, M.F.; NOIREAU, F.; YACSIK, N.; LIEGEARD, P.; AZNAR, C.; HONTEBEYRIE, M.** 2002. Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 289–295.
- **CAMPOS, R.; ACUÑA-RETAMAR, M.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.E.; SOLARI, A.** 2007. Susceptibility of *Mepraia spinolai* and *Triatoma infestans* to different *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected rodent hosts. *Acta Trop* 104: 25–29.
- **CANALS, M.; EHRENELD, M.; SOLIS, R.; CRUZAT, L.; PINOCHET, A.; TAPIA, C.; CATTAN, P.E.**1998. Biología comparada de *Mepraia spinolai* en condiciones de laboratorio y terreno: cinco años de estudio. *Parasitol dia* 22 (3-4):72-78.
- **CARCAVALLO, R.U.** 1999. Climatic factors related to Chagas disease transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(I): 367-369.
- **CARDINAL, M.V.; LAURICELLA, M.A.; CEBALLOS, L.A.; LANATI, L.; MARCET, P.L.; LEVIN, M.J.; KITRON, U.; GURTLER, R.E.; SCHIJMAN, A.G.** 2008. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int Jour Paras* 38:1533–1543.
- **CEBALLOS, L.A.; VASQUEZ-PROKOPEC, G.M.; CECERE, M.C.; MARCET, P.L.; GÜRTLER, R.E.** 2005. Feeding rates, nutritional status and flight dispersal potential of peridomestic populations of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Trop* 95: 149-159.
- **CORONADO, X.; ZULANTAY, I.; ALBRECHT, H.; ROZAS, M.; APT, W.; ORTIZ, S.; 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. *Am J Trop Med Hyg* 74(6): 1008–1012.
- **CORONADO, X.; ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.E.; SOLARI, A.** 2009. Molecular Epidemiology of Chagas Disease in the Wild Transmission Cycle: The Evaluation in the Sylvatic Vector *Mepraia spinolai* from an Endemic Area of Chile. *Am J Trop Med Hyg* 81(4): 656–659.
- **CURA, C.; SCHIJMAN, A.G.** 2013. Relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la presentación clínica de la enfermedad de chagas. *Rev Esp Salud Pública* 86: 9-16.
- **DEGRAVE, W.; FRAGOSO, S.P.; BRITTO, C.; VAN HEUVERS WYN, H.; KIDANE, G.Z.; CARDOSO, M.A.B.; MUELLER, R.U.; SIMPSON, L.; MOREL, C.M.** 1988. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasit.* 27: 63-70.
- **DE LANA, M.; PINTO, A.S.; BARNABÉ, C.; QUESNEY, V.; NOEL, S.; TIBAYRENC, M.** 1998. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility

of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. Exp Parasitol 90: 20–25.

- **DIOSQUE, P.; BARNABÉ, C.; PADILLA, A.; MARCO, J.; CARDOZO, R.; CIMINO, R.; NASSERD, J.; TIBAYRENC, M.; BASOMBRÍO, M.** 2003. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. Int J Parasitol 33: 997–1003.
- **FRÍAS-LASSERRE, D.** 2010. A New Species and Karyotype Variation in the Bordering Distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardo* in Chile and its Parapatric Model of Speciation. Neotrop Entomol. 39 (4): 572-583.
- **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 Trop 111: 90–93
- **GAJARDO, R.** 1995. La vegetación natural de Chile. Clasificación y distribución geográfica. 2ª Ed. Editorial Universitaria, Santiago. 165p.
- **GARCÍA, E.S.; RATCLIFFE, N.A.; WHITTENC, M.M.; GONZALEZ, M.S.; AZAMBUJA, P.** 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *T. cruzi*–*R. prolixus* interactions. J Insect Physiol 53: 11–21
- **GONZÁLES, N.; CARRASCO, H.; URDANETA-MORALES, S.; MARTÍNEZ, C.; HERRERA, L.** 2009. Comportamiento de genotipos de *Trypanosoma cruzi* en *Rhodnius prolixus* experimentalmente infectado: aproximación biológica y molecular a fenómenos de competencia. Salus online (12)1: 175 – 184.
- **GUHL, F.** 2013. Epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi*. Rev Esp Salud Pública 1(8): 7-14
- **INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA.** 2012. Vigilancia para Enfermedad de Chagas 2005 - 2011: Componente vectorial. Boletín ISP 2(1): 1-3.
- **KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A.** 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. Parasitol Today 16: 381–387.
- **LORCA, M.; GARCÍA, A.; BAHAMONDE, M.I.; FRITZ, A.; TASSARA, R.** 2001. Certificación serológica de la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Chile. Rev Méd Chile 129(3): 264-269.
- **LUKES, J.; GUILBRIDE, D.L.; VOTYPKA, J.; ZIKOVA, A.; BENNE, R.; ENGLUNDS, P.T.** 2002. Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. Eukaryot Cell. 1(4): 495–502.
- **MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D.J.** 2004. *Trypanosoma cruzi*: Genetic Structure of Populations and Relevance of Genetic Variability to the Pathogenesis of Chagas Disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 99(1):
- **NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A.M.** 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. Vet Res. 40:26.
- **ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD.** 2004. Evaluación Programa de Chagas Chile 2003. In: XIII Reunión de la Comisión Intergubernamental para

Eliminación de *T. infestans* e Interrupción de la Tripanosomiasis Americana por Transfusión. Buenos Aires, Argentina. 29-31 de Marzo. Pp. 77-78.

- **PINTO, A.S.; DE LANA, B.; BASTRENTA, B.; BARNABÉ, C.; QUESNEY, V.; NOEL, S.; TIBAYRENC, M.** 1998. Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. Parasitol Res 84: 348–353.
- **PINTO, A.S.; DE LANA, M.; BRITTO, C.; BASTRENTA, B.; TIBAYRENC, M.** 2000. Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. Int J Parasitol 30: 843–848.
- **RIOSECO, R.; TESSER, C.** 2012. Cartografía Interactiva de los climas de Chile [en línea] Instituto de Geografía. Pontificia Universidad Católica de Chile. <www.uc.cl/sw_educ/geografia/cartografiainteractiva> [consulta: 02-04-2014].
- **ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.E.; SOLARI, A.** 2007. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Wild and Periodomestic Mammals in Chile. Am J Trop Med Hyg 77(4): 647-653.
- **SÁNCHEZ, G.; WALLACE, A.; OLIVARES, M.; AGUILERA, X.; APT, W.; SOLARI, A.** 1990. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* zymodemes: *in vitro* differentiation of epimastigotes and infectivity of culture metacyclic trypomastigotes into mice. Exp Parasitol 71: 125–133.
- **SCHAUB, G.A.; LÖSCH, P.** 1989. Parasite/host-interrelationships of the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Blastocrithidia triatomae* and the reduviid bug *Triatoma infestans*: influence of starvation of the bug. Ann Trop Med Parasitol 83: 215-223.
- **SCHWEIGMANN, N.; VALLVÉ, S.; MUSCIO, O.; GHILLINI, M.; ALBERTI, A.; WISNIVESKY-COLLI, C.** 1988. Dispersal flight by *Triatoma infestans* in an arid area of Argentina. Med Vet Entomol 2: 401-404.
- **SEGOVIA, V.** 2010. Genotipos clonales de *Trypanosoma cruzi* presentes en ejemplares de *Triatoma infestans* provenientes de áreas silvestres y domiciliarias de la región Metropolitana y V Región. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 66p.
- **TOLEDO, M.J.; BAHIA, M.T.; CARNEIRO, C.; MARTINS-FILHO, O.A.; TIBAYRENC, M.; BARNABE, C.; TAFURI, W.L.; LANA, M.** 2003. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. Antimicrob Agents Chemother. 47: 223–230.
- **TOLEDO, A.; VERGARA, F.; CAMPOS, R.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; CORONADO, X.; SOLARI, A.** 2013. Short Report: *Trypanosoma cruzi* Genotypes in *M. gajardoi* from Wild Ecotopes in Northern Chile. Am J Trop Med Hyg 88(2): 285–288.
- **TORRES, J.P.; ORTIZ, S.; MUÑOZ, S.; SOLARI, A.** 2004. *Trypanosoma cruzi* isolates from Chile are heterogeneous and composed of mixed populations when characterized by schizodeme and Southern analyses. Parasitology 128: 161–168.

- **TORRES-PÉREZ, F.; ACUNA-RETAMAR, M.; COOK, J.A.; BACIGALUPO, A.; GARCÍA, A.; CATTAN, P.E.** 2011. Statistical phylogeography of Chagas disease vector *Triatoma infestans*: Testing biogeographic hypotheses of dispersal. *Infect Genet Evol* 11:167–174.
- **VAGO, A.R.; ANDRAD, L.O.; LEITE, A.A.; DAVILA, D.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; TOSTES, S.; MOREIRA, M.C.V; FILHO, G.B.; PENA, S.D.J.** 2000. Genetic Characterization of *T. cruzi* Directly from Tissues of Patients with Chronic Chagas Disease: Differential Distribution of Genetic Types into Diverse Organ. *Am J Pathol*.156 (5):1805-1809.
- **VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; SCHAUB, G.A.** 2009. Triatominae–*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector–parasite interactions. *Acta Trop* 110: 137–147
- **VEAS, F.; BRENIÉRE, S.F.; CUNY, G.; BRENGUES, C.; SOLARI, A.; TIBAYRENC, M.** 1991. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *T. cruzi* for sensitive detection by PCR. *Cell Mol Biol* 37: 73–84
- **VENEGAS, J.; ROJAS, T.; DÍAZ, F.; MIRANDA, S.; JERCIC, M.I.; GONZÁLEZ, C.; COÑOEPÁN, W.; PICHUANES, S.; RODRÍGUEZ, J.; GAJARDO, M.; SÁNCHEZ, G.** 2011. Geographical structuring of *Trypanosoma cruzi* populations from Chilean *Triatoma infestans* triatomines and their genetic relationship with other Latino American counterparts. *Ann Trop Med Parasitol* 105: 625–646.
- **ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G.** 2009. A new consensus for *T. cruzi* intraspecific nomenclature: 2nd revision meeting Recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(7):1051-1054.
- **ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.G.; SCHIJMAN, A.G.; LLEWELLYN, M.S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE. S.G.; STURM, N.R.** 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12: 240–253.