



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN PROSPECTIVA DE LINAJES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN *OCTODON DEGUS* NATURALMENTE INFECTADOS**

**María Alejandra Sandoval Rodríguez**

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

PROFESOR GUÍA:

ALDO SOLARI ILLESCAS

Facultad de Medicina, Universidad de Chile

PROYECTO FONDECYT 1120122

SANTIAGO, CHILE

2014

## INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
OBJETIVOS.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXOS.....	48

## INDICE DE TABLAS

- Tabla N° 1. Linajes de <i>T. cruzi</i> detectados en sangre al momento de la captura.	19
- Tabla N° 2. Cantidad de sangre ingerida por los triatominos según especie durante el primer xenodiagnóstico.	20
- Tabla N° 3. Linajes de <i>T. cruzi</i> detectados 40, 80 y 120 días post primer xenodiagnóstico.	21
- Tabla N° 4. Variaciones temporales de linajes de <i>T. cruzi</i> detectados en triatominos luego del primer xenodiagnóstico.	23
- Tabla N° 5. Porcentajes de detección de linajes de <i>T. cruzi</i> para los 11 <i>O. degus</i> estudiados luego del primer xenodiagnóstico.	23
- Tabla N° 6 Porcentajes de detección de linajes de <i>T. cruzi</i> para los distintos grupos de triatominos luego del primer xenodiagnóstico.	24
- Tabla N° 7. Cantidad de sangre ingerida por los triatominos según especie durante el segundo xenodiagnóstico.	25
- Tabla N° 8. Linajes de <i>T. cruzi</i> detectados 40, 80 y 120 días post segundo xenodiagnóstico.	27
- Tabla N° 9. Variaciones temporales de linajes de <i>T. cruzi</i> detectados en triatominos luego del segundo xenodiagnóstico.	28
- Tabla N° 10. Porcentajes de detección de linajes de <i>T. cruzi</i> para los 11 <i>O. degus</i> estudiados luego del segundo xenodiagnóstico.	29
- Tabla N° 11 Porcentajes de detección de linajes de <i>T. cruzi</i> para los distintos grupos de triatominos luego del segundo xenodiagnóstico.	30
- Tabla N° 12. Linajes de <i>T. cruzi</i> detectados en 3 procedimientos diagnósticos.	30
- Tabla N° 13. Frecuencia de detección de linajes de <i>T. cruzi</i> en el tiempo.	37
- Tabla N° 14. Frecuencia de detección de linajes de <i>T. cruzi</i> en el tiempo según especie de triatomo.	37
- Tabla N° 15. Resumen final de linajes de <i>T. cruzi</i> detectados en los ejemplares en estudio tras 3 procedimientos diagnósticos.	38

## INDICE DE FIGURAS

- Figura N° 1. Variaciones en la identidad de los linajes de <i>T. cruzi</i> detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para <i>O. degus</i> n° 2.	31
- Figura N° 2. Variaciones en la identidad de los linajes de <i>T. cruzi</i> detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para <i>O. degus</i> n° 3.	32
- Figura N° 3. Variaciones en la identidad de los linajes de <i>T. cruzi</i> detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para <i>O. degus</i> n° 7.	32
- Figura N° 4. Variaciones en la identidad de los linajes de <i>T. cruzi</i> detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para <i>O. degus</i> n° 8.	33
- Figura N° 5. Variaciones en la identidad de los linajes de <i>T. cruzi</i> detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para <i>O. degus</i> n° 10.	33
- Figura N° 6. Variaciones en la identidad de los linajes de <i>T. cruzi</i> detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para <i>O. degus</i> n° 13.	34
- Figura N° 7. Variaciones en la identidad de los linajes de <i>T. cruzi</i> detectados al análisis de sangre, y primer xenodiagnóstico para <i>O. degus</i> n° 22.	34
- Figura N° 8. Variaciones en la identidad de los linajes de <i>T. cruzi</i> detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para <i>O. degus</i> n° 27.	35
- Figura N° 9. Variaciones en la identidad de los linajes de <i>T. cruzi</i> detectados al análisis de sangre, y primer xenodiagnóstico para <i>O. degus</i> n° 28.	35
- Figura N° 10. Variaciones en la identidad de los linajes de <i>T. cruzi</i> detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para <i>O. degus</i> n° 29.	36
- Figura N° 11. Variaciones en la identidad de los linajes de <i>T. cruzi</i> detectados al análisis de sangre, y primer xenodiagnóstico para <i>O. degus</i> n° 30.	36

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad zoonótica producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Actualmente se reconocen seis linajes distintos de *T. cruzi*, conocidos también como unidades discretas de tipificación (DTUs). Estos corresponden a TcI-TcVI. La presencia de distintos linajes de *T. cruzi* ha sido detectada con anterioridad en el roedor endémico *Octodon degus*, observándose variaciones temporales en la presentación sanguínea de éstos. Un total de 11 ejemplares silvestres de *O. degus*, previa confirmación de infección con *T. cruzi* mediante ensayo de PCR a muestras de sangre periférica, fueron sometidos a dos ensayos de xenodiagnóstico separados por 6 meses en promedio. Utilizando los resultados del muestreo de sangre y ambos procedimientos de xenodiagnóstico se determinó la identidad del o los linajes de *T. cruzi* presentes en la sangre de los roedores en tres momentos distintos. Se utilizaron tres especies distintas de vectores, empleándose ejemplares de *Triatoma infestans* y *Mepraia gajardoii* durante el primer xenodiagnóstico y ejemplares *T. infestans* y *Mepraia spinolai* durante el segundo. Las heces de los triatomíneos fueron analizadas en tres oportunidades luego de cada xenodiagnóstico. Se detectaron variaciones en la identidad de los linajes de *T. cruzi* detectados en las heces de los triatomíneos a lo largo del seguimiento realizado de forma posterior a cada xenodiagnóstico. Conjuntamente fue posible evidenciar la existencia de variaciones temporales en la presentación sanguínea de linajes de *T. cruzi* en los 11 roedores estudiados luego de los tres procedimientos diagnósticos realizados.

## SUMMARY

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a zoonotic disease produced by the flagellate *Trypanosoma cruzi*. Currently there are six different recognized lineages of *T. cruzi* which are also known as discrete typing units (DTUs). These are TcI-TcVI. The presence of different lineages of *T. cruzi* has been previously reported in the endemic rodent *Octodon degus* in which temporal fluctuations of these lineages in the blood stream have been observed. A total of 11 wild specimens of *O. degus* that were previously confirmed as infected with *T. cruzi* by PCR analysis of blood samples were submitted to two xenodiagnosis procedures separated by an average of 6 months. Using the results obtained from the blood samples and both xenodiagnosis procedures the identity of the circulating lineages of *T. cruzi* was determined at three different moments. Three different species of vectors were used, *Triatoma infestans* and *Mepraia gajardo* individuals were used during the first xenodiagnosis and *T. infestans* and *Mepraia spinolai* individuals were used during the second procedure. Triatomine feces were analyzed in three opportunities after each xenodiagnosis. Temporal fluctuations in the identity of *T. cruzi* lineages detected in the feces were observed during the follow up to which the triatomine groups were submitted. It was also possible to observe temporal fluctuations of *T. cruzi* lineages detected in the blood stream of all the 11 studied rodents.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad zoonótica producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Este parásito se transmite al ser humano principalmente por las heces infectadas de insectos triatomíneos conocidos en Chile como vinchucas, siendo *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai*, *Mepraia gajardoi* y la recientemente descrita *Mepraia parapátrica* las especies presentes en el territorio nacional (Botto-Mahan *et al.*, 2008; Frías, 2010; WHO, 2013).

*T. cruzi* se caracteriza por presentar tres estados morfológicos celulares distintos, los cuales se asocian a las diferentes etapas de su ciclo biológico (Atias, 1998; Fredes, 2010).

Actualmente se reconocen seis linajes distintos de *T. cruzi*, conocidos también como unidades discretas de tipificación (DTUs). Estos corresponden a TcI-TcVI (Zingales *et al.*, 2009; Guhl, 2013).

Debido al gran número de animales silvestres que actúa como reservorio del parásito, la principal forma de control de la enfermedad se relaciona al control del vector (WHO, 2013).

Diversos estudios realizados en Chile han permitido detectar la presencia de *T. cruzi* en especies silvestres. Uno de los mamíferos afectados corresponde al roedor nativo de Chile *Octodon degus*, especie en la cual ha sido posible observar niveles variables de infección que oscilan entre valores de un 20% a un 61% (Botto-Mahan *et al.*, 2010).

Los diferentes linajes de *T. cruzi* pueden coexistir dentro de un mismo hospedero siendo este el caso para *O. degus*. Así mismo, la presentación sanguínea de estos linajes puede variar en el tiempo (Campos *et al.*, 2007).

El presente estudio evaluó la existencia de variaciones temporales de distintos linajes de *T. cruzi* en 11 ejemplares de *O. degus* naturalmente infectados.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad zoonótica producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Es endémica en América Latina donde representa un problema de salud pública ya que corresponde a una afección crónica debilitante que afecta la salud, bienestar y productividad de la población afectada (Rodríguez *et al.*, 2004; WHO, 2013). El parásito se transmite al ser humano principalmente por las heces infectadas de insectos triatómíneos conocidos en Chile como vinchucas. Estos insectos suelen picar zonas expuestas de la piel para luego defecar cerca de la picadura (WHO, 2013).

Debido al gran número de animales silvestres que actúan como reservorio del parásito y al hecho de que no existe una vacuna que permita prevenir la aparición de la enfermedad, la forma más eficiente de control de la enfermedad radica en el control vectorial (WHO, 2013).

*T. cruzi* fue descrito en Brasil en 1909 por Carlos Chagas. Corresponde a un protozoo flagelado del orden Kinetoplástida, orden que se caracteriza por poseer una gran mitocondria también conocida como kinetoplasto. El DNA kinetoplastídico representa cerca del 20% del DNA total del parásito y se conforma de minicírculos y maxicírculos de DNA encadenados que forman una compleja red compacta. Existe un número abundante de copias de minicírculos por parásito presentando heterogenicidad en sus secuencias para cada linaje de *T. cruzi*. Los minicírculos codifican RNA guías, los que se encargan de la modificación post transcripcional, llamada "editing", de los RNAm mitocondriales (Sturn y Simpson, 1990). Cada minicírculo presenta cuatro regiones de secuencia altamente conservadas, las cuales se distribuyen cada 90° y se conforman de aproximadamente 120 pares de bases (pb). De la misma forma, cada minicírculo contiene cuatro regiones hipervariables que codifican para los RNA guías. Estas regiones se localizan entre las regiones conservadas y se componen de alrededor de 250 pb cada una (Simpson, 1987; Sturn y Simpson, 1990).

Existen tres estados morfológicos celulares de *T. cruzi*: tripomastigote, epimastigote y amastigote. Estos se asocian a las diferentes etapas del ciclo biológico del parásito (Fredes, 2010).



Los potenciales vectores para *T. cruzi* comprenden más de 130 especies de triatomíneos de la familia Reduviidae. Adicionalmente a los seres humanos, un amplio espectro de mamíferos puede ser infectado y eventualmente puede actuar como reservorio del parásito. Diferente distribución geográfica de hospederos vertebrados y triatomíneos, junto a preferencias de los insectos por su fuente de sangre, definen dos ciclos distintos de transmisión para *T. cruzi*: el doméstico/peridoméstico y el selvático (Buscaglia y Di Noia, 2003).

El ciclo biológico de *T. cruzi* incluye la participación de un hospedero vertebrado y de uno invertebrado (vector), limitándose al tracto digestivo de éste último. El parásito se inocula a través de las heces del vector, penetrando al hospedero por membranas mucosas o por la herida causada por la picadura (Fredes, 2010). Los triatomíneos se infectan al ingerir la sangre de mamíferos infectados con tripomastigotes, los cuales una vez ubicados en el lumen del intestino medio se diferencian a la forma de epimastigotes y se multiplican por fisión binaria. Luego de 15 a 30 días, los epimastigotes migran y colonizan la pared del intestino posterior donde se transforman en tripomastigotes metacíclicos. Una vez que el parásito presente en las heces del triatomíneo ingresa al torrente sanguíneo del hospedero vertebrado, penetra las células del sistema retículo endotelial del hígado, bazo, células de la glía y músculos miocárdico y esquelético. Dentro de éstas se multiplica por fisión binaria bajo la forma de amastigote hasta producir la ruptura de las células infectadas, liberándose tripomastigotes derivados de células al torrente sanguíneo los cuales pueden penetrar otras células. El ciclo se completa cuando triatomíneos no infectados ingieren sangre de mamíferos infectados con tripomastigotes (Atias, 1998; Fredes, 2010).

La infección por *T. cruzi* tiene etapas clínicas secuenciales en humanos. La fase aguda inicial se caracteriza por una parasitemia patente que puede durar por 40-60 días. Los síntomas pueden ser leves y atípicos y, como consecuencia, la infección suele no ser reconocida en esta etapa. Durante la fase aguda, el parásito compromete el sistema inmune del hospedero como resultado de una disminución de las células del timo y de una intensa activación de linfocitos. Este fenómeno constituye un obstáculo en la estimulación de respuestas antiparasitarias protectoras. Luego de la fase aguda, los pacientes pasan a una fase crónica de duración indeterminada que puede durar años o persistir indefinidamente. Esta fase se caracteriza por la ausencia de síntomas clínicos relevantes

y una parasitemia muy baja o nula, pese a que los pacientes permanecen positivos a las pruebas serológicas (Buscaglia y Di Noia, 2003).

Luego de aproximadamente 20 años de la infección, alrededor del 35% de los pacientes desarrollan signos patológicos característicos de la enfermedad de Chagas tales como cardiomiopatía, daño al sistema nervioso periférico o disfunción del sistema digestivo que suele llevar a megaesófago y/o megacolon (Buscaglia y Di Noia, 2003).

Numerosos obstáculos impiden el control efectivo de esta enfermedad. Pese a que la enfermedad de Chagas es físicamente debilitante y su letalidad es incuestionable ya no es percibida como un problema de salud pública mayor en varios países. Es posible que esto se deba en parte a que la enfermedad de Chagas afecta a comunidades vulnerables. Esto ha llevado a que la enfermedad sea considerada como desatendida por la Organización Panamericana de la Salud (Noireau *et al.*, 2009).

La epidemiología de la enfermedad de Chagas ha cambiado en los últimos años. Inicialmente se consideraba que la principal forma de transmisión era la vectorial, sin embargo, la puesta en acción de diversos programas de control del vector ha conllevado a que otras formas de transmisión consideradas inicialmente como secundarias hayan adquirido mayor importancia. Una vez que el control vectorial es eficaz, el contagio congénito y por transfusiones de sangre se vuelven más importantes, no solo en latinoamérica sino también en países norteamericanos y europeos donde ocurre inmigración humana (Noireau *et al.*, 2009). También son de preocupación patrones de transmisión emergentes que involucran triatomíneos silvestres que han comenzado a expresar hábitos sinantrópicos y están entrando en contacto con seres humanos (Noireau *et al.*, 2009).

### **Vectores de la enfermedad de Chagas**

Los vectores de la enfermedad de Chagas pertenecen al orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Corresponden a insectos de desarrollo hemimetábolo o metamorfosis incompleta que luego de eclosionar de su huevo deben pasar por cinco estados ninfales antes de alcanzar la adultez. Su desarrollo se caracteriza por ser lento y prolongado, pudiendo durar varios meses, y es influenciado por factores como la

temperatura, la humedad y la disponibilidad de alimento. En lo que se refiere a su alimentación, los triatominos son, en todas las etapas de su vida, hematófagos estrictos; siendo la alimentación sanguínea requisito para que éstos puedan realizar la muda y cambiar de estado (Atías, 1998).

En Chile existen cuatro especies de triatominos: *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai*, *Mepraia gajardoi* (Botto-Mahan *et al.*, 2008) y la recientemente descrita *Mepraia parapátrica* (Frías, 2010). *T. infestans* corresponde a la especie doméstica mientras *M. spinolai* y *M. gajardoi* corresponden a especies silvestres endémicas (Botto-Mahan *et al.*, 2008).

*T. infestans* es una especie de hábitos nocturnos que, en Chile, vive a lo largo de un rango latitudinal (18-34°S) que incluye múltiples biomas, incluyendo desiertos del norte, desiertos semi-áridos, y áreas centrales mediterráneas (Torres-Pérez *et al.*, 2010; Bacigalupo *et al.*, 2012). Ha sido considerado como el único vector de hábitos domiciliarios, siendo por ello sometido a medidas de control. Sin embargo, se ha observado recientemente que *T. infestans* ha colonizado áreas silvestres en localidades rurales de Chile central (Bacigalupo *et al.*, 2012).

*M. spinolai* corresponde a una especie endémica que ha sido reportada como naturalmente infectada con *T. cruzi*. La detección de DNA perteneciente a *T. cruzi* en poblaciones del norte de Chile indica que 43,2% de los insectos se encuentran infectados. A diferencia de otros triatominos, *M. spinolai* es un insecto de hábitos diurnos con un máximo de actividad al medio día (Botto-Mahan *et al.*, 2005).

Pese a que individuos de *M. spinolai* pueden usualmente ser encontrados en colinas rocosas, grietas de piedras, nidos de aves y mamíferos, y corrales de animales domésticos, pueden ocasionalmente ser encontrados en residencias humanas (Botto-Mahan *et al.*, 2005). Es por ello que *M. spinolai* es una especie potencialmente peligrosa debido a los altos niveles de infección con *T. cruzi* y al incremento de colonización en áreas rurales, sobre todo luego de que el vector doméstico, *T. infestans*, haya sido técnicamente erradicado (Botto-Mahan *et al.*, 2005).

*M. gajardoi* se distribuye en la costa norte de Chile entre 18° y 26°S y se encuentra asociada a nidos de aves marinas y cuevas de reptiles. Botto-Mahan *et al.* (2008) reportan que este vector se encuentra naturalmente infectado con *T. cruzi* detectando la presencia de TcII y un linaje desconocido en un grupo de 17 ejemplares de *M. gajardoi* (Botto-Mahan *et al.*, 2008).

### **Linajes de *Trypanosoma cruzi***

Pese a que estudios iniciales sobre la genética de las poblaciones de *T. cruzi* determinaron que éste presenta una estructura clonal, la secuenciación de diversos loci tanto nucleares como mitocondriales ha llevado al descubrimiento de genotipos con características híbridas, por lo que hoy en día se cree que *T. cruzi* poseería la capacidad de recombinar DNA. Sin embargo, estos intercambios ocurrirían de forma excepcional en las poblaciones naturales por lo que los linajes de *T. cruzi* se mantienen estables en el tiempo y espacio (Westenberger *et al.*, 2005).

Una clasificación basada en estudios filogenéticos distingue dos linajes de *T. cruzi* conocidos como *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Brisse *et al.*, 2001). *T. cruzi* II, a su vez, es subdividido en 5 grupos, TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcII d y TcIIe. (Westernberger *et al.*, 2005; Zingales *et al.*, 2009).

El nuevo sistema de clasificación reconoce seis linajes distintos de *T. cruzi*, también conocidos como unidades discretas de tipificación (DTUs). Éstos corresponden a TcI-TcVI (Zingales *et al.*, 2009; Guhl, 2013). Adicionalmente ha sido reportada recientemente la existencia de un nuevo genotipo de *T. cruzi* denominado TcBat. Este nuevo linaje estaría asociado de forma estricta a murciélagos de Brasil y Panamá (Guhl, 2013). Cabe mencionar que el uso de diversos marcadores moleculares en estudios recientes ha permitido demostrar la existencia de una gran variabilidad genética dentro del linaje de TcI (Guhl, 2013).

El estudio de los diversos linajes resulta de gran interés e importancia considerando que hallazgos realizados por diversos autores sugieren que la respuesta inmune del hospedador puede variar dependiendo del linaje o linajes que lo infecten. Conjuntamente se ha reportado variabilidad en la capacidad de causar daño celular al evidenciar por

ejemplo que TcI juega un papel importante en las formas severas de cardiopatía chagásica (Guhl, 2013).

### ***Trypanosoma cruzi* en mamíferos silvestres**

Se ha determinado que más de 150 especies de mamíferos silvestres se encuentran infectadas con *T. cruzi*. Algunos de estos reservorios juegan un rol importante en la mantención e interacción de los ciclos doméstico, peridoméstico y silvestre de la enfermedad de Chagas (Campos *et al.*, 2007).

En áreas hiperendémicas para la enfermedad de Chagas, los niveles de infección en mamíferos silvestres pueden alcanzar valores de hasta 61% en promedio (Botto-Mahan *et al.*, 2012). Un estudio en el cual 158 muestras de sangre pertenecientes a mamíferos silvestres fueron analizadas determinó una prevalencia del 61% de la infección tanto en mamíferos silvestres como en el roedor endémico *Octodon degus* (Rozas *et al.*, 2007).

La coexistencia de múltiples linajes circulando en el mismo bioma e incluso en el mismo animal es probablemente una ocurrencia común en mamíferos silvestres (Noireau *et al.*, 2009).

Los roedores caviomorfos poseen una historia coevolutiva con *T. cruzi* ya que llegaron a América hace aproximadamente 35 millones de años (Noireau *et al.*, 2009). *O. degus* es una especie de reproducción lenta de actividad diurna y que vive en comunidades de hasta 100 individuos. Esta especie abundante puede ser encontrada en ecosistemas semiáridos o mediterráneos, donde puede alimentarse de hierbas, hojas de arbustos y semillas. Su esperanza de vida en condiciones de libertad es de alrededor de tres años, pero en cautiverio puede alcanzar los seis a ocho años de edad (Botto-Mahan *et al.*, 2012).

Evidencia molecular indica que la prevalencia de *T. cruzi* en poblaciones silvestres de este roedor varía de un 20 a un 61%, dependiendo probablemente de las condiciones climáticas (Botto-Mahan *et al.*, 2012). Similarmente, otro estudio que utilizó la técnica de xenodiagnóstico para determinar la presencia de *T. cruzi* en 35 ejemplares de *O. degus* silvestres evidenció una prevalencia del 22,9% (Campos *et al.*, 2007).

Un estudio realizado por Botto-Mahan *et al.* (2012) buscó determinar el efecto de la infección por *T. cruzi* en la sobrevivencia de ejemplares de *O. degus* silvestres. No existió diferencia entre en la sobrevivencia de roedores infectados y no infectados; de la misma forma, tampoco se detectaron diferencias de peso o índice de masa corporal entre *O. degus* infectados versus no infectados. Si bien se deben considerar más aspectos, estos hallazgos entregan pistas sobre la efectividad de *O. degus* como reservorio de la enfermedad de Chagas. Al no ser afectada la sobrevivencia del roedor éste puede transmitir el parásito a múltiples triatomíneos a lo largo de su vida (Botto-Mahan *et al.*, 2012).

Otros factores que deben tomarse en cuenta al considerar la capacidad de *O. degus* como reservorio son la posibilidad de transmisión por lactancia. Este tipo de transmisión sería muy importante para *O. degus* ya que esta especie practica lactancia comunitaria. Segundo, se ha descrito la ocurrencia de transmisión congénita en roedores de laboratorio, sin embargo, esto dependería del linaje con el que se encuentre infectada la madre. Tercero, *O. degus* tiene una alta capacidad de dispersión, lo que aumenta el rango de interacción entre parásito, vector y hospedero. En cuarto lugar, *O. degus* es un roedor cuyos parámetros de vida pueden ser afectados positivamente por el cambio climático, específicamente bajo un escenario en el que el fenómeno de El Niño se vuelve más frecuente y prolongado (Botto-Mahan *et al.*, 2012).

Los diferentes linajes de *T. cruzi* pueden coexistir dentro de un mismo hospedero siendo este el caso de *O. degus*. Así mismo, la presentación sanguínea de estos linajes puede variar en el tiempo. Dicho fenómeno fue evidenciado por Campos *et al.* (2010) al reportar la existencia de variaciones temporales en la presentación de distintos linajes de *T. cruzi* en la sangre periférica de *O. degus*.

Dicho estudio utilizó dos roedores que presentaron resultados positivos a la presencia de *T. cruzi* al utilizar dos especies distintas de vectores (*T. infestans* y *M. spinolai*) para realizar xenodiagnóstico. Ambos roedores fueron sometidos a exámenes de xenodiagnóstico seriados con el objetivo de determinar la identidad de los linajes circulantes en su sangre en diferentes momentos: al tiempo cero, luego de un año, luego de dos años, y luego de dos años y medio. Uno de los roedores se encontraba infectado

únicamente con TcI, linaje que fue detectado durante las primeras tres mediciones pero no fue detectado en la cuarta. El segundo roedor presentaba una infección mixta con los linajes TcI, TcII y TcVI al tiempo cero, al análisis realizado un año después fue posible detectar la presencia de los linajes TcI y TcV, luego de dos años solamente se detectó la presencia de TcII, escenario que se repitió en la medición realizada seis meses después (Campos *et al.*, 2010).

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la presencia de distintos linajes de *Trypanosoma cruzi* en sangre de ejemplares de *Octodon degus* naturalmente infectados y su consistencia temporal.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar linajes de *Trypanosoma cruzi* en la sangre de ejemplares de *Octodon degus* naturalmente infectados en distintos tiempos.
2. Evaluar la existencia de variaciones temporales de linajes de *Trypanosoma cruzi* presentes en la sangre de ejemplares de *Octodon degus* naturalmente infectados por medio de xenodiagnóstico.
3. Evaluar la existencia de variaciones temporales de linajes de *Trypanosoma cruzi* presentes en las heces de triatomíneos alimentados con sangre periférica proveniente de *Octodon degus* naturalmente infectados.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.- *Octodon degus***

Se utilizaron 11 ejemplares silvestres positivos a *T. cruzi*, cinco hembras y seis machos. Los individuos fueron capturados durante el mes de enero de 2013 en la Reserva Nacional Las Chinchillas, siendo sexados y marcados con crotales que poseen combinaciones numéricas únicas. Adicionalmente se obtuvo al momento de la captura 0,2 ml de sangre mediante punción de la vena safena con el objetivo de determinar infección por *T. cruzi* y la identidad de los linajes específicos que infectaban a cada espécimen. Posterior a su captura los ejemplares fueron trasladados a la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Chile a un bioterio equipado con aire acondicionado que permitió la mantención de una temperatura ambiental estable que bordeó los 25°C. Los roedores se mantuvieron en jaulas en grupos de dos a cuatro individuos del mismo sexo. Cada jaula fue rotulada indicando el número del crotal de los animales que se encuentran en ella y el sexo de los mismos. La alimentación se realizó en base a alimento comercial LabDiet® utilizando una fórmula especial para conejillos de indias la cual fue suplementada con verduras y frutas. El agua fue proporcionada *ad libitum*. Adicionalmente se utilizaron cubos de madera y cilindros de cartón a modo de enriquecimiento ambiental. Tanto la manipulación de los ejemplares de *O. degus* como su mantención en cautiverio fueron aprobadas por el Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### **2.- Triatominos usados en xenodiagnóstico**

Se utilizaron ninfas de estadio II pertenecientes a las especies *M. gajardoi*, *M. spinolai* y *T. infestans*. Todas las ninfas se obtuvieron a partir de colonias criadas en cautiverio confirmadas como libres de *T. cruzi*. Los triatominos fueron mantenidos en una cámara incubadora que proporciona condiciones óptimas de crecimiento (27° C, 75% de humedad relativa, y un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas de obscuridad), perteneciente al Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. La manipulación y mantención en cautiverio de los

triatominos fueron aprobadas por el Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### **3.- Xenodiagnóstico**

El xenodiagnóstico corresponde a una técnica diagnóstica que permite detectar la presencia de *T. cruzi* en mamíferos. El procedimiento se basa en el uso del vector de la enfermedad de Chagas como medio biológico de cultivo para el parásito. La técnica implica el uso de un número determinado de ninfas las cuales no han sido alimentadas por un periodo de aproximadamente cuatro semanas. Se permite que estos ejemplares se alimenten del individuo a diagnosticar y se espera un periodo de 30 días para obtener muestras de deyecciones (Schenone *et al.*, 2000).

Para realizar el xenodiagnóstico, cada roedor fue capturado manualmente y depositado en una bolsa plástica transparente que contenía un trozo de algodón embebido en Isoflurano. Posteriormente el ejemplar fue masado utilizando una balanza eléctrica e inyectado con una asociación 1/1 de Xilacina al 2,3% y Ketamina al 11,2%. La cantidad a inyectar dependió tanto del peso del animal como de su respuesta a ambos anestésicos, utilizándose una dosis de entre 3,5 a 4,9 mg/kg de Xilacina y entre 16,9 a 23,6 mg/kg de Ketamina. Para realizar las inyecciones se utilizaron jeringas de 1 ml.

Luego de que el ejemplar se encontrase anestesiado, se colocó en una caja de plástico transparente dentro de la cual también se depositaron los triatominos del xenodiagnóstico. La cantidad de triatominos utilizados por cada roedor varió de acuerdo al peso de éste.

Para determinar el volumen de sangre ingerida por los triatominos estos fueron masados una vez finalizado el xenodiagnóstico restando el peso promedio de cada especie de triatominos en condiciones de ayuno.

A modo de establecer dicho promedio se pesaron 50 ejemplares ninfa II sin alimentar de la especie *T. infestans* y 50 ejemplares, en igualdad de condiciones, del género *Mepraia*. Esto permitió determinar que, en condiciones de ayuno, cada individuo perteneciente a la especie *T. infestans* pesa, en promedio, 3,46 µg (E.E = 0,13). Dicho valor es de 2,70 µg (E.E. = 0,1) para *Mepraia* spp.

Una vez finalizado el pesaje, los ejemplares fueron almacenados en cajas de plástico debidamente rotuladas que contienen compartimientos individuales para cada ejemplar.

Durante el primer procedimiento de xenodiagnóstico se utilizaron en promedio 7,18 triatomos por cada ejemplar de *O. degus*, extrayéndose de esta manera un promedio de 70,89  $\mu\text{l}$  de sangre total por cada roedor (rango: 11,16  $\mu\text{l}$  - 106,94  $\mu\text{l}$ ).

Con el objetivo de aumentar las probabilidades de ingestión de parásitos por parte de las vinchucas, durante el segundo xenodiagnóstico el número promedio de triatomos utilizados por *O. degus* incrementó a 11,2. De esta forma se extrajeron en promedio 201,21  $\mu\text{l}$  de sangre total por cada roedor (rango: 123,36  $\mu\text{l}$  - 239,42  $\mu\text{l}$ ).

Finalizados los procedimientos de xenodiagnóstico se esperó un periodo de 40 días tras los cuales las ninfas fueron alimentadas utilizando un espécimen de laboratorio libre de infección (*Mus musculus*). Luego de la alimentación se procedió a recolectar muestras de heces utilizando una cantidad aproximada de 10  $\mu\text{l}$  en 100  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada. Las muestras fueron almacenadas en tubos Eppendorf y conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para ser sometidas posteriormente a PCR y genotipificación. Las ninfas fueron alimentadas un total de tres veces luego del xenodiagnóstico, estando cada una de estas alimentaciones separada por un periodo aproximado de 40 días (Anexo N° 1). Tras cada alimentación se recolectaron muestras de deyecciones siguiendo el protocolo previamente mencionado.

Las deyecciones de los triatomos fueron almacenadas y procesadas de forma separada dependiendo del individuo de *O. degus*, de la especie de vinchuca y de la cantidad de tiempo transcurrido luego del xenodiagnóstico.

Las especies de triatomos utilizadas en cada xenodiagnóstico fueron distintas. Durante el primer procedimiento de xenodiagnóstico se utilizaron especímenes pertenecientes a las especies *M. gajardoi* y *T. infestans* mientras que durante el segundo se utilizaron triatomos de las especies *M. spinolai* y *T. infestans*.

La realización de los procedimientos de xenodiagnóstico estuvo supeditada a la disponibilidad de triatomos criados en laboratorio, siendo el género silvestre *Mepraia* difícil de mantener en condiciones de cautiverio. Es por ello que si bien el lapso de tiempo

promedio entre la toma de muestra de sangre y el primer xenodiagnóstico fue de 4,5 meses (E.E. = 0,16), y el tiempo promedio entre ambos procedimientos de xenodiagnóstico fue de 6 meses (E.E. = 0,42) (Anexo N° 1), en la práctica dichos periodos de tiempo fueron distintos para cada roedor.

Si bien inicialmente se planificó utilizar, en todo los roedores analizados, una combinación de vinchucas del género *Mepraia* y de la especie *T. infestans*, debido a falta de disponibilidad de ejemplares de la especie *T. infestans*, el primer xenodiagnóstico en tres de los 11 roedores analizados se realizó utilizando solamente especímenes de la especie *M. gajardoi*.

#### **4.- Detección de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR**

Para realizar la detección del parásito se utilizaron las muestras de heces de triatomos previamente obtenidas y se sometieron a ensayo de PCR. Esta técnica permite amplificar las regiones hipervariables de los minicírculos del DNA kinetoplastídico de *T. cruzi*.

Las muestras se hirvieron durante 15 minutos tras lo cual se sometieron a una centrifugación rápida en tubos Eppendorf. Se obtuvieron 5 µl del sobrenadante, los cuales fueron agregados a una mezcla que contiene: 3 µl de los oligonucleótidos 121 (5'- AAA TAA TGT ACG GGG GAG ATG CAT GA-3') y 122 (5'- GTT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA -3') a una concentración de 25 µM, 5 µl de buffer de Taq polimerasa (que contiene final en el ensayo 67 mM Tris-HCl pH 8.8, 16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 6.7 mM MgCl<sub>2</sub>, y 10 mM 2-mercaptoetanol.), 0,5 µl de BSA 1%, 5 µl (0.4 mM) de los cuatro dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 4 unidades de Taq polimerasa (0,5 µl) y agua bidestilada para un volumen final de 50 µl.

El proceso de amplificación se realizó utilizando un termociclador Techne® TC-512 y que consistió en 2 ciclos iniciales de 98° C por 1 min y 64° C por 2 min; 33 ciclos intermediarios de 94° C por 1 min y 64° C por 1 min y un ciclo final de 72° C por 10 min. Además de las muestras de heces, fueron sometidos al proceso de amplificación dos controles. Un control negativo de PCR, en el cual los 5 µl de muestra de DNA fueron reemplazados por agua destilada y un control positivo con DNA purificado de *T. cruzi*.

Para visualizar el producto amplificado se realizó electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Para ello se obtuvieron 10 µl de producto amplificado a los cuales se agregaron 4 µl de buffer de carga 6X azul celeste. A los controles negativo y positivo se les agregó 20 µl del mismo buffer. Se preparó también un tubo adicional con 2 µl de marcador de peso molecular y 3 µl de buffer de carga 6X azul de bromofenol y xileno cianol. Las muestras se cargaron al gel el cual fue sometido a 100 v por 45 minutos. El gel se examinó utilizando un transiluminador digital de Bio Rad®.

La presencia de una única banda al mismo nivel que la banda de 330 bp del marcador de peso molecular y del control positivo indicó la presencia del DNA kinetoplastídico y, en consecuencia, un resultado positivo de PCR.

Inicialmente los ensayos de PCR fueron realizados utilizando muestras de heces no purificadas. De un total de 26 ensayos realizados a las muestras de heces de triatominos solamente nueve entregaron resultados positivos. Con el objetivo de descartar la presencia de inhibidores en la muestras de deyecciones que pudiesen alterar la reacción en cadena de la polimerasa, se decidió purificar las muestras utilizando un kit comercial E.Z.N.A. Blood DNA Mini Kit OMEGA bio-tek®, siguiendo las instrucciones del fabricante para la purificación de sangre y fluidos corporales. El material amplificado final fue suspendido en 100 µl de agua bidestilada. Con la excepción de dos roedores durante el segundo xenodiagnóstico, la purificación de las muestras de heces permitió detectar la presencia de *T. cruzi* en todos los roedores por lo menos en una oportunidad a lo largo del estudio.

Pese a la obtención de resultados positivos al ensayo de PCR para las muestras de *O. degus* n°7, 10, 13, 27, y 29 durante el primer análisis del segundo xenodiagnóstico y para las muestras de *O. degus* n° 2, 3 y 8 durante el primer y segundo análisis del segundo xenodiagnóstico, no fue posible repetir los mismos resultados para el segundo y tercer análisis de las muestras provenientes de los roedores n°7, 10, 13, 27, y 29 ni para el tercer análisis de las muestras provenientes de los roedores n° 2, 3 y 8. Dado que los triatominos habían entregado resultados positivos con anterioridad, y basándose en la experiencia de Araújo *et al.* (2014) en la cual para obtener resultados positivos al ensayo de PCR fue necesario concentrar el DNA obtenido mediante purificación, es que se decidió concentrar una mayor cantidad de DNA y repetir la prueba de PCR. Para ello se

realizó una segunda purificación de las muestras del segundo análisis provenientes de los ejemplares de *M. spinolai* de los roedores n° 7, 10, 13, 27 y 29 y una segunda purificación de las muestras del tercer análisis provenientes de los ejemplares de *M. spinolai* y *T. infestans* de los roedores n° 3 y 8 y de los ejemplares de *M. spinolai* del roedor n° 2. Se mezcló el material obtenido luego de ambas purificaciones obteniéndose un volumen de 200 µl. Se procedió a evaporar el agua que contenía el material purificado hasta obtener un volumen de 50 µl tras lo cual se repitió la prueba de PCR. Este experimento permitió la obtención de resultados positivos para las muestras 7, 10, 13, y 29 y para las muestras 3 y 8 provenientes de *M. spinolai*. Debido a limitaciones de tiempo estas muestras no fueron genotipificadas.

## **5.- Genotipificación**

### **5.1.- Transferencia del DNA a membranas por difusión simple**

Se realizaron geles en cuadruplicado con los resultados positivos de PCR, cada gel se sometió a incubación dos veces en presencia de una solución de NaOH 0.5 N y NaCl 1.5 M por 20 min cada una. Posteriormente, se neutralizó dos veces con una solución de Tris-HCl 1M pH 7,4 y NaCl 1,5 M, con agitación constante durante 20 min cada vez. Finalizado este tratamiento, el gel fue invertido sobre un papel filtro Whatman 3MM saturado previamente con una solución SSC 2x (NaCl 3M, citrato de Na 0.3 M) que sirve como puente. Sobre el gel invertido se colocó la membrana de nylon y el papel absorbente. Todo el sistema fue presionado con un peso de aproximadamente 1 kg por toda una noche para transferir el DNA por capilaridad desde el gel a la membrana de nylon Hybond<sup>+</sup>. Después de terminada la transferencia, el DNA fue fijado a la membrana irradiando ésta última con luz UV por dos min y luego se dejó secar.

### **5.2.- Preparación de la sonda**

Para este ensayo se utilizaron las sondas que detectan los linajes TcI, TcII, TcV y TcVI las cuales son generadas desde los clones de *T. cruzi* sp104, NR, CBB y V195, respectivamente. Para confeccionar las sondas, se realizó un PCR usando los primers CV1 y CV2 para cada uno de los clones a ocupar. Una vez terminada la reacción, el producto amplificado se digirió con las enzimas de restricción (ScaI y Sau 96I) utilizando

las condiciones indicadas por el fabricante. Luego, se visualizó el producto mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Una vez comprobado que el fragmento poseía el tamaño adecuado, el producto se purificó previa electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y se extrajo el DNA con un kit de purificación de DNA QIAGEN® dejando los fragmentos de DNA listos para la radiomarcación.

### **5.3.- Marcación radioactiva de la sonda**

Las sondas de DNA kinetoplastídico fueron marcadas utilizando el kit de marcación Rediprime de Amersham®. Para esto, se desnaturizó el DNA por calentamiento y enfriamiento rápido en hielo. En un volumen final de 50 µl la mezcla de reacción tuvo además del DNA 2U del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*, 5 µl de dCTP marcado en posición alfa con P<sup>32</sup>, los nucleótidos dGTP, dATP y dTTP a 1 mM, oligonucleótidos al azar y tampón de reacción incluido en el kit. La incubación se realizó por 30 min, luego de lo cual se purificó la sonda marcada por cromatografía de exclusión en resina P6 BioRad®.

### **5.4.- Hibridación con la sonda radiactiva**

Las membranas fueron prehibridadas con solución de hibridación (5x SSC, reactivo bloqueador 0.5% p/v, laurilsarcosinato de sodio 0.1%, SDS 0.02% p/v) en un frasco de hibridación a 55° C por 2 h, distribuyendo la solución en un horno rotatorio. Luego se eliminó al máximo la solución de hibridación y se agregaron 5 ml de solución fresca de hibridación la cual contenía la sonda de DNA marcada con P<sup>32</sup> previamente desnaturalizada. Las membranas se incubaron toda la noche en un horno rotatorio a 55°C y luego se lavaron dos veces por 30 minutos a 50° C con 50 ml de solución SSC 2x, SDS 0.1% y dos veces por 15 minutos a 55° C. Finalmente, para visualizar las muestras hibridadas con la sonda marcada, las membranas se colocaron en una pantalla cuantificadora de P-imager Bio Rad®.

Todos los procedimientos de laboratorio fueron realizados respetando los requerimientos de bioseguridad establecidos por la Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

## **6.- Análisis de datos**

Se utilizó la prueba T de Student para determinar la existencia de diferencias significativas en los  $\mu$ l de sangre ingeridos por las distintas especies de triatominos.

Las variaciones en la presentación sanguínea de los distintos linajes fueron analizadas utilizando la prueba de  $\chi^2$ , con el objetivo de determinar la existencia de una relación entre la frecuencia de aparición de los linajes y el momento de muestreo (Sokal y Rohlf, 1995).



## RESULTADOS

### LINAJES EN SANGRE

Los linajes detectados en sangre al momento de la captura de los roedores pueden observarse en la tabla N° 1.

**Tabla N° 1.** Linajes de *T. cruzi* detectados en sangre al momento de la captura. (+) indica muestras positivas al ensayo de PCR pero que no entregaron resultados con ninguna de las sondas utilizadas para la genotipificación.

<b><i>Octodon degus</i></b>	<b>Linajes</b>
<i>O. degus</i> n°2	(+)
<i>O. degus</i> n°3	TcI - TcII - TcV - TcVI
<i>O. degus</i> n°7	TcVI
<i>O. degus</i> n°8	TcII - TcV - TcVI
<i>O. degus</i> n°10	TcII - TcV - TcVI
<i>O. degus</i> n°13	TcII - TcV - TcVI
<i>O. degus</i> n° 22	TcII - TcV - TcVI
<i>O. degus</i> n°27	(+)
<i>O. degus</i> n°28	TcV - TcVI
<i>O. degus</i> n°29	TcII - TcV
<i>O. degus</i> n°30	TcV - TcVI

Como es posible observar en la tabla, al momento de la toma de muestra de sangre se detectó la presencia de los cuatro linajes estudiados en uno de los roedores. Cuatro se encontraban infectados con una combinación de TcII, TcV y TcVI, dos con una combinación de TcV y TcVI, uno con una combinación de TcII y TcV, solamente un individuo presentó infección única (con TcVI). Finalmente en dos casos no fue posible determinar la identidad de los linajes presentes en las muestras de sangre pese a haber obtenido resultados positivos al ensayo de PCR previamente.

## XENODIAGNÓSTICO 1

Como fue mencionado con anterioridad, una vez finalizado el procedimiento de xenodiagnóstico se procedió a determinar el volumen de sangre ingerido por los triatomos mediante pesaje de los mismos. Dichos valores pueden observarse en la Tabla N° 2.

**Tabla N° 2.** Cantidad de sangre ingerida por los triatomos según especie durante el primer xenodiagnóstico.

<i>Octodon degus</i>	Especie triatomo	N° de triatomos usados	µl de sangre ingeridos por triatomo	µl de sangre ingeridos (µl totales)
<i>O. degus 2</i>	<i>M. gajardoi</i>	6	10,6	63,9
	<i>T. infestans</i>	2	21,5	43,1
<i>O. degus 3</i>	<i>M. gajardoi</i>	4	12,3	49,2
	<i>T. infestans</i>	1	16,5	16,5
<i>O. degus 7</i>	<i>M. gajardoi</i>	8	6,1	48,5
<i>O. degus 8</i>	<i>M. gajardoi</i>	8	6,1	48,5
<i>O. degus 10</i>	<i>M. gajardoi</i>	7	1,6	11,2
<i>O. degus 13</i>	<i>M. gajardoi</i>	4	12,3	49,2
	<i>T. infestans</i>	3	9,9	29,6
<i>O. degus 22</i>	<i>M. gajardoi</i>	4	14,8	59,2
	<i>T. infestans</i>	3	13,2	39,6
<i>O. degus 27</i>	<i>M. gajardoi</i>	3	14,0	41,9
	<i>T. infestans</i>	5	8,5	42,7
<i>O. degus 28</i>	<i>M. gajardoi</i>	4	12,3	49,2
	<i>T. infestans</i>	3	9,9	29,6
<i>O. degus 29</i>	<i>M. gajardoi</i>	4	12,3	49,2
	<i>T. infestans</i>	3	9,9	29,6
<i>O. degus 30</i>	<i>M. gajardoi</i>	4	12,3	49,2
	<i>T. infestans</i>	3	9,9	29,6

Se utilizó la prueba T de student en busca de diferencias significativas entre los µl de sangre ingeridos por *T. infestans* y *M. gajardoi* no detectándose diferencias significativas entre ambas especies ( $t = -0,99$ ;  $P = 0,34$ ) (Anexo N° 2).

El contenido intestinal de los triatominos de xenodiagnóstico fue analizado en tres ocasiones, estando cada uno de estos análisis separados por un periodo de aproximadamente 40 días.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla N° 3 y Anexo N° 6.

**Tabla N° 3.** Linajes de *T. cruzi* detectados 40, 80 y 120 días post primer xenodiagnóstico. Las barras diagonales indican muestras para las cuales se obtuvieron resultados negativos al ensayo de PCR. El signo (+) indica muestras positivas al ensayo de PCR pero que no entregaron resultados con ninguna de las sondas utilizadas para la genotipificación.

<i>Octodon degus</i>	Especie triatomino	40 días	80 días	120 días
<i>O. degus</i> n°2	<i>M. gajardoi</i>	Tcl	/	/
	<i>T. infestans</i>	TcVI	TcVI	/
<i>O. degus</i> n°3	<i>M. gajardoi</i>	TcV	TcVI	Tcl – TcV – TcVI
	<i>T. infestans</i>	Tcl	(+)	Tcl
<i>O. degus</i> n°7	<i>M. gajardoi</i>	TcVI	Tcl	/
<i>O. degus</i> n°8	<i>M. gajardoi</i>	Tcl-TcII-TcV-TcVI	TcVI	Tcl – TcVI
<i>O. degus</i> n°10	<i>M. gajardoi</i>	TcV	/	/
<i>O. degus</i> n°13	<i>M. gajardoi</i>	(+)	/	Tcl – TcVI
	<i>T. infestans</i>	/	/	Tcl – TcVI
<i>O. degus</i> n° 22	<i>M. gajardoi</i>	/	/	Tcl – TcVI
	<i>T. infestans</i>	/	/	/
<i>O. degus</i> n°27	<i>M. gajardoi</i>	Tcl - TcVI	/	Tcl – TcVI
	<i>T. infestans</i>	/	/	/
<i>O. degus</i> n°28	<i>M. gajardoi</i>	TcVI	/	Tcl – TcVI
	<i>T. infestans</i>	/	/	/
<i>O. degus</i> n°29	<i>M. gajardoi</i>	Tcl	/	/
	<i>T. infestans</i>	/	/	/
<i>O. degus</i> n°30	<i>M. gajardoi</i>	/	/	Tcl – TcVI
	<i>T. infestans</i>	/	/	Tcl – TcV – TcVI

Del total de 11 grupos de *M. gajardoi* utilizados para realizar el xenodiagnóstico todos dieron resultados positivos al ensayo de PCR, siendo el porcentaje de infección para *M. gajardoi* de un 100%. Dentro de estos, ocho presentaron infecciones mixtas (72,7%). De estas infecciones mixtas, seis fueron una asociación de Tcl y TcVI (75%), uno es una

asociación de TcI, TcV y TcVI (12,5%) y una es con los cuatro linajes estudiados (12,5%). Las infecciones únicas detectadas en los grupos de *M. gajardoi* (3 de 11, es decir un 27,3%) fueron dos con el linaje TcI y una con el linaje TcV.

En lo que a *T. infestans* se refiere, cuatro de los ocho grupos utilizados dieron resultados positivos al ensayo de PCR, por lo que, para este grupo, el porcentaje de infección detectado fue de un 50%. Dentro de estos cuatro grupos, dos presentaron infecciones mixtas (50%), siendo una de estas con una asociación de TcI y TcVI (50%) y la otra con una asociación de TcI, TcV y TcVI. Las infecciones únicas fueron con los linajes TcVI y TcI.

Por ende, en cuatro de los ocho roedores para los cuales se utilizaron insectos de ambas especies la identidad de los linajes presentes en sangre fue determinada utilizando muestras de heces provenientes únicamente de los ejemplares de *M. gajardoi*.

Adicionalmente es posible observar que, para los roedores en los cuales se emplearon ambas especies de triatominos y se obtuvieron resultados positivos al ensayo de PCR con ambas especies, en tres oportunidades los linajes o la combinación de estos mismos detectados por los especímenes de *M. gajardoi* no fueron iguales a los detectados por *T. infestans*. A modo de ejemplo se puede mencionar la situación de *O. degus* n°2, en este caso se detectó la presencia de TcI en las heces provenientes del grupo de *M. gajardoi* mientras que se detectó TcVI en las heces provenientes del grupo de *T. infestans*.

### **Variaciones temporales en la identidad de los linajes detectados en las heces triatominos**

A modo de evaluar la existencia de variaciones temporales en la identidad de los linajes detectados en las heces de los triatominos a lo largo del tiempo, se consideraron las muestras para las cuales se obtuvieron resultados positivos al ensayo de PCR en más de una ocasión. Esto ocurrió en seis oportunidades:

**Tabla N° 4.** Variaciones temporales de linajes de *T. cruzi* detectados en triatominos luego del primer xenodiagnóstico.

<i>Octodon degus</i>	Especie triatomo	40 días	80 días	120 días
<i>O. degus</i> n°3	<i>M. gajardoi</i>	TcV	TcVI	Tcl – TcV – TcVI
	<i>T. infestans</i>	Tcl	(+)	Tcl
<i>O. degus</i> n°7	<i>M. gajardoi</i>	TcVI	Tcl	/
<i>O. degus</i> n°8	<i>M. gajardoi</i>	Tcl-TcII-TcV-TcVI	TcVI	Tcl – TcVI
<i>O. degus</i> n°27	<i>M. gajardoi</i>	Tcl - TcVI	/	Tcl – TcVI
<i>O. degus</i> n°28	<i>M. gajardoi</i>	TcVI	/	Tcl – TcVI

En cuatro de las seis ocasiones los linajes detectados en las heces de los insectos varió en el tiempo. Estos cuatro grupos de vinchucas en los cuales fueron detectadas variaciones en la identidad de los linajes detectados equivalen al 26,7% de los grupos estudiados positivos a *T. cruzi*.

En lo que a los ejemplares de *O. degus* se refiere, nueve de los 11 roedores diagnosticados presentaron infecciones mixtas (81,8%). Dentro de esos nueve, seis tenían una combinación de Tcl y TcVI (66,7% de los *O. degus* con infecciones mixtas), dos una combinación de Tcl, TcV y TcVI (22,2%) y uno presentaba los cuatro linajes (11,1%). Los linajes de *T. cruzi* detectados en las infecciones únicas (18,2% de los roedores) fueron TcV y Tcl.

Al observar los resultados de los tres análisis en conjunto para los ejemplares de *O. degus* se pueden observar los siguientes porcentajes de infección:

**Tabla N° 5.** Porcentajes de detección de linajes de *T. cruzi* para los 11 *O. degus* estudiados luego del primer xenodiagnóstico.

Tcl	81,8%
TcII	9,1%
TcV	36,4%
TcVI	81,8%

Considerando únicamente los grupos de triatomos para los cuales se obtuvieron resultados positivos al ensayo de PCR, es posible establecer los siguientes porcentajes de infección:

**Tabla N° 6.** Porcentajes de detección de linajes de *T. cruzi* para los distintos grupos de triatomos luego del primer xenodiagnóstico.

	<i>M. gajardoi</i>	<i>T. infestans</i>
Tcl	90,9%	75%
TcII	9,1%	0%
TcV	27,3%	25%
TcVI	72,7%	75%

## XENODIAGNÓSTICO 2

Se repite el procedimiento de xenodiagnóstico a los mismos individuos, con excepción de *O. degus* n° 28 que falleció durante el periodo comprendido entre ambos procedimientos. Nuevamente se determinó el volumen de sangre ingerido por los triatomino mediante pesaje de los mismos. Dichos valores pueden observarse en la Tabla N° 7.

**Tabla N° 7.** Cantidad de sangre ingerida por los triatomino según especie durante el segundo xenodiagnóstico.

<i>Octodon degus</i>	Especie triatomino	N° de triatomino usados	µl de sangre ingeridos por triatomino	µl de sangre ingeridos (µl totales)
<i>O. degus</i> 2	<i>M. spinolai</i>	5	19,0	116,5
	<i>T. infestans</i>	3	19,9	59,6
<i>O. degus</i> 3	<i>M. spinolai</i>	6	20,6	123,9
	<i>T. infestans</i>	3	16,5	49,6
<i>O. degus</i> 7	<i>M. spinolai</i>	8	24,8	198,5
	<i>T. infestans</i>	3	10,2	30,6
<i>O. degus</i> 8	<i>M. spinolai</i>	6	27,3	163,9
	<i>T. infestans</i>	3	19,9	59,6
<i>O. degus</i> 10	<i>M. spinolai</i>	7	23,5	164,2
	<i>T. infestans</i>	5	12,9	64,7
<i>O. degus</i> 13	<i>M. spinolai</i>	7	25,7	180,2
	<i>T. infestans</i>	6	9,9	59,3
<i>O. degus</i> 22	<i>M. spinolai</i>	7	24,2	169,2
	<i>T. infestans</i>	5	13,3	66,7
<i>O. degus</i> 27	<i>M. spinolai</i>	7	21,3	149,2
	<i>T. infestans</i>	4	10,3	41,2
<i>O. degus</i> 29	<i>M. spinolai</i>	7	22,0	154,2
	<i>T. infestans</i>	6	8,1	37,3
<i>O. degus</i> 30	<i>M. spinolai</i>	7	13,1	76,2
	<i>T. infestans</i>	7	6,8	47,8

Se detectaron diferencias significativas que indican que –ante igualdad de condiciones- los triatominos pertenecientes a la especie *M. spinolai* ingirieron más sangre que los triatominos pertenecientes a la especie *T. infestans* ( $t = 4,82$ ;  $P = 0,00014$ ) (Anexo N° 3). Al comparar los resultados obtenidos tras los pesajes de *M. gajardoi* y *M. spinolai* se obtienen diferencias significativas que indican que los individuos de *M. spinolai* ingirieron más sangre que los de *M. gajardoi* ( $t = -6,63$ ;  $P = 2,43 \times 10^{-6}$ ) (Anexo N° 4).

Finalmente, la prueba de T fue aplicada una cuarta oportunidad para comprar los  $\mu\text{g}$  de sangre ingeridos por los individuos de *T. infestans* en ambos xenodiagnósticos. No se detectaron diferencias significativas en la cantidad de sangre ingerida por los triatominos en estas dos oportunidades ( $t = -0,17$ ;  $P = 0,86$ ) (Anexo N° 5).

El contenido intestinal de los triatominos fue analizado en tres ocasiones posteriores al xenodiagnóstico, obteniéndose los resultados que pueden observarse en la Tabla N° 8 y Anexo n° 7.



**Tabla N° 8.** Linajes de *T. cruzi* detectados 40, 80 y 120 días post segundo xenodiagnóstico. Las barras diagonales indican muestras para las cuales se obtuvieron resultados negativos al ensayo de PCR. El signo (+) indica muestras positivas al ensayo de PCR pero que no fueron genotipificadas.

<i>Octodon degus</i>	Especie triatomino	40 días	80 días	120 días
<i>O. degus</i> 2	<i>M. spinolai</i>	TcII - TcV - TcVI	TcII - TcV	/
	<i>T. infestans</i>	TcII - TcV	TcII - TcV	/
<i>O. degus</i> 3	<i>M. spinolai</i>	TcII - TcV	TcII - TcV	(+)
	<i>T. infestans</i>	TcII - TcV	TcII - TcV	/
<i>O. degus</i> 7	<i>M. spinolai</i>	/	(+)	/
	<i>T. infestans</i>	TcII - TcV	/	/
<i>O. degus</i> 8	<i>M. spinolai</i>	TcII - TcV - TcVI	TcII - TcV	(+)
	<i>T. infestans</i>	TcII - TcV	TcII - TcV	/
<i>O. degus</i> 10	<i>M. spinolai</i>	TcII - TcV	(+)	/
	<i>T. infestans</i>	TcII - TcV	/	/
<i>O. degus</i> 13	<i>M. spinolai</i>	TcII - TcV	(+)	/
	<i>T. infestans</i>	TcII - TcV	/	/
<i>O. degus</i> 22	<i>M. spinolai</i>	/	/	/
	<i>T. infestans</i>	/	/	/
<i>O. degus</i> 27	<i>M. spinolai</i>	TcII - TcV	/	/
	<i>T. infestans</i>	TcII - TcV	/	/
<i>O. degus</i> 29	<i>M. spinolai</i>	TcII - TcV	(+)	/
	<i>T. infestans</i>	TcI - TcII - TcV - TcVI	/	/
<i>O. degus</i> 30	<i>M. spinolai</i>	/	/	/
	<i>T. infestans</i>	/	/	/

De los 10 grupos de *M. spinolai* utilizados ocho fueron positivos al ensayo de PCR, evidenciándose un porcentaje de infección de 80%. Dentro de estos ocho grupos, dos se encontraban infectados con una asociación de TcII, TcV y TcVI (25% de las muestras positivas) y cinco con una asociación de TcII y TcV (62,5%). Una de las muestras positivas no fue genotipificada por lo que se desconoce la identidad del o los linajes presentes en ella (esta muestra equivale al 12,5% de las muestras positivas).

Por otra parte, de los 10 grupos de *T. infestans* utilizados ocho resultaron positivos a la presencia de *T. cruzi*, lo que se traduce en un porcentaje de infección para este grupo de

80%. En siete de ellos se detectaron asociaciones de TcII y TcV (87,5% de las muestras positivas). Uno de ellos presentó los cuatro linajes estudiados (12,5%).

Nuevamente es posible observar que en tres oportunidades los linajes o la combinación de estos mismos detectados por las diferentes especies de triatomíneos para el mismo *O. degus* no coinciden completamente. A modo de ejemplo se puede mencionar el caso de *O. degus* n° 29 para el cual, durante el primer análisis post xenodiagnóstico, se detectó una combinación de TcII y TcV en las muestras provenientes del grupo de *M. spinolai* mientras que, durante el mismo análisis, fue posible detectar los cuatro linajes estudiados en las muestras provenientes del grupo de *T. infestans*.

### Variaciones temporales en la identidad de los linajes detectados en las heces de los triatomíneos

Al igual que en la primera ocasión, se consideraron las muestras para las cuales se obtuvieron resultados positivos al ensayo de PCR en más de una ocasión. En esta oportunidad esto ocurrió nueve veces:

**Tabla N° 9.** Variaciones temporales de linajes de *T. cruzi* detectados en triatomíneos luego del segundo xenodiagnóstico.

<i>Octodon degus</i>	Especie triatomino	40 días	80 días	120 días
<i>O. degus</i> 2	<i>M. spinolai</i>	TcII - TcV - TcVI	TcII - TcV	/
	<i>T. infestans</i>	TcII - TcV	TcII - TcV	/
<i>O. degus</i> 3	<i>M. spinolai</i>	TcII - TcV	TcII - TcV	(+)
	<i>T. infestans</i>	TcII - TcV	TcII - TcV	/
<i>O. degus</i> 8	<i>M. spinolai</i>	TcII - TcV - TcVI	TcII - TcV	(+)
	<i>T. infestans</i>	TcII - TcV	TcII - TcV	/
<i>O. degus</i> 10	<i>M. spinolai</i>	TcII - TcV	(+)	/
<i>O. degus</i> 13	<i>M. spinolai</i>	TcII - TcV	(+)	/
<i>O. degus</i> 29	<i>M. spinolai</i>	TcII - TcV	(+)	/

La identidad de los linajes detectados en las heces de los insectos varió en dos oportunidades. En ambas ocasiones, la primera correspondiente a la muestra de *M. spinolai* para *O. degus* n°2 y la segunda a la muestra de *M. spinolai* para *O. degus* n° 8 se

detectó, durante el primer análisis, una infección mixta con los linajes TcII, TcV y TcVI y luego durante el segundo análisis no es posible volver a detectar la presencia de TcVI. Estos dos grupos de vinchucas equivalen al 13,3% de los grupos estudiados positivos a *T. cruzi*.

En lo que a los ejemplares de *O. degus* se refiere, y considerando nuevamente la sumatoria de los resultados obtenidos luego de realizar tres análisis en el tiempo, es posible evidenciar que ocho de los 10 individuos analizados fueron positivos a la presencia de *T. cruzi* siendo posible determinar la identidad de los linajes en todas las muestras. Se detectó la presencia de los linajes TcII y TcV en todos los roedores positivos, 5 de ellos se encontraban infectados con una asociación de TcII y TcV (62,5%), 2 con una asociación de TcII, TcV y TcVI (25%) y uno presentaba los cuatro linajes estudiados (12,5%). No se detectaron individuos con infecciones únicas.

Dos de los roedores analizados (*O. degus* n° 22 y 30) presentaron resultados negativos durante los tres análisis.

Al observar los resultados de los tres estudios en conjunto para los ejemplares de *O. degus* que entregaron resultados positivos, se pueden observar los siguientes porcentajes de infección:

**Tabla N° 10.** Porcentajes de detección de linajes de *T. cruzi* para los 11 *O. degus* estudiados luego del segundo xenodiagnóstico.

TcI	12,5%
TcII	100%
TcV	100%
TcVI	37,5%

De la misma forma es posible determinar los siguientes porcentajes de infección para los grupos de triatomos utilizados:

**Tabla N° 11.** Porcentajes de detección de linajes de *T. cruzi* para los distintos grupos de triatomíneos luego del segundo xenodiagnóstico.

	<i>M. spinolai</i>	<i>T. infestans</i>
Tcl	0%	12,5%
TcII	87,5%	100%
TcV	87,5%	100%
TcVI	25%	12,5%

### Variaciones en la identidad de los linajes detectados en *O. degus* a través del tiempo

Para determinar la existencia de variaciones temporales de los linajes de *T. cruzi* detectados en la sangre de los ejemplares incluidos en el estudio, se compararon los resultados obtenidos gracias a la toma de muestra de sangre al momento de la captura y a los obtenidos luego de ambos procedimientos de xenodiagnóstico.

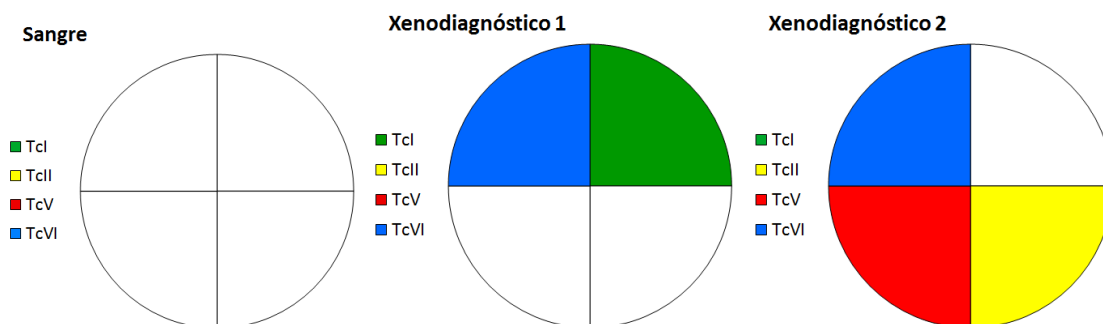
**Tabla N° 12.** Linajes de *T. cruzi* detectados en tres procedimientos diagnósticos. Las barras diagonales indican muestras para las cuales se obtuvieron resultados negativos al ensayo de PCR.

El signo (+) indica muestras positivas al ensayo de PCR pero que no entregaron resultados con ninguna de las sondas utilizadas para la genotipificación. El signo † indica fallecimiento del animal.

<i>Octodon degus</i>	Muestra de sangre	Xenodiagnóstico 1	Xenodiagnóstico 2
<i>O. degus</i> 2	(+)	Tcl - TcVI	TcII - TcV - TcVI
<i>O. degus</i> 3	Tcl - TcII - TcV - TcVI	Tcl - TcV - TcVI	TcII - TcV
<i>O. degus</i> 7	TcVI	Tcl - TcVI	TcII - TcV
<i>O. degus</i> 8	TcII - TcV - TcVI	Tcl - TcII - TcV - TcVI	TcII - TcV - TcVI
<i>O. degus</i> 10	TcII - TcV - TcVI	TcV	TcII - TcV
<i>O. degus</i> 13	TcII - TcV - TcVI	Tcl - TcVI	TcII - TcV
<i>O. degus</i> 22	TcII - TcV - TcVI	Tcl - TcVI	/
<i>O. degus</i> 27	(+)	Tcl - TcVI	TcII - TcV
<i>O. degus</i> 28	TcV - TcVI	Tcl - TcVI	†
<i>O. degus</i> 29	TcII - TcV	Tcl	Tcl - TcII - TcV - TcVI
<i>O. degus</i> 30	TcV - TcVI	Tcl - TcV - TcVI	/

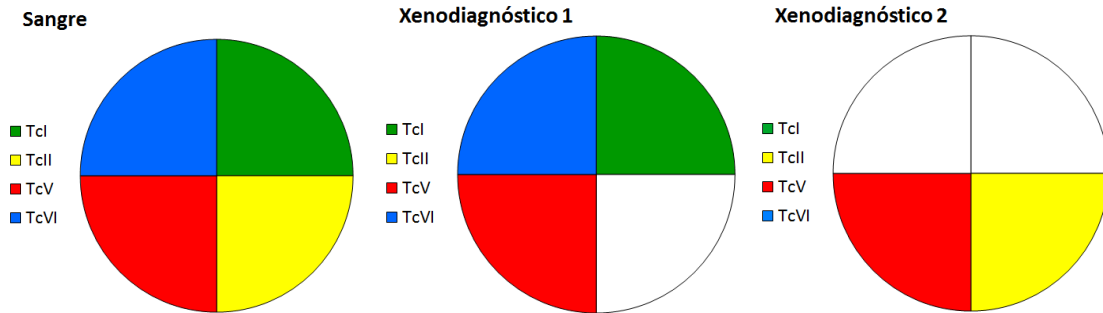
Como es posible observar en la tabla, fue posible detectar variaciones en los linajes detectados para todos los ejemplares de *O. degus*. En cinco oportunidades no fue posible establecer una comparación utilizando los tres análisis realizados, esto debido a la existencia de dos muestras que no pudieron ser genotipificadas, dos *O. degus* que entregaron resultados negativos al ensayo de PCR y al fallecimiento de uno de los ejemplares de *O. degus* antes de que pudiese realizarse el segundo procedimiento de xenodiagnóstico.

Para *O. degus* n°2 no fue posible determinar la identidad de el o los linajes presentes en la toma de muestra al momento de la captura, sin embargo, al realizar el primer xenodiagnóstico puede observarse la presencia de los linajes TcI y TcVI. Estos resultados cambian al momento del segundo xenodiagnóstico donde se detecta la presencia TcII, TcV y TcVI.



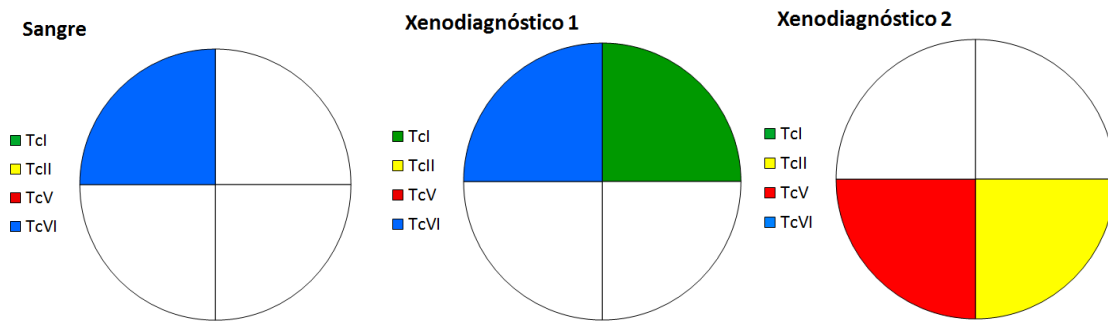
**Figura N° 1.** Variaciones en la identidad de los linajes detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para *O. degus* n° 2.

Para *O. degus* n°3 al primer análisis (muestra de sangre posterior a la captura) se detectó la presencia de los cuatro linajes estudiados. Durante el primer xenodiagnóstico se observa la presencia de TcI, TcV y TcVI y al momento del segundo xenodiagnóstico se detecta una combinación de TcII y TcV.



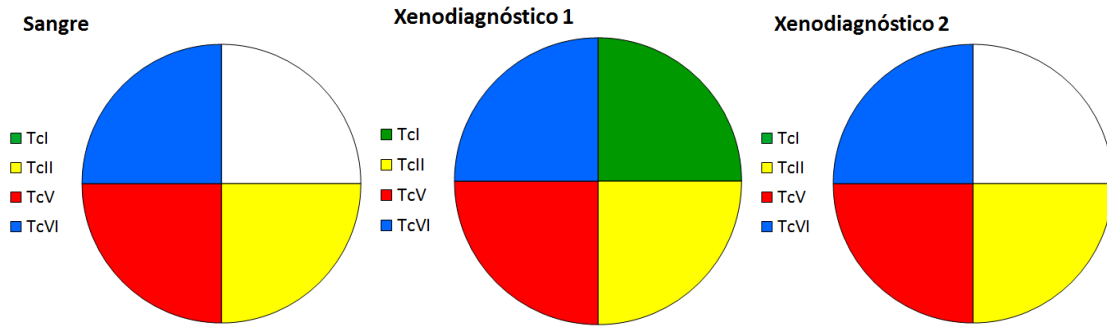
**Figura N° 2.** Variaciones en la identidad de los linajes detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para *O. degus* n° 3.

Para *O. degus* n°7 se observa una infección única con TcVI al analizar la muestra de sangre, una infección con TcI y TcVI durante el primer xenodiagnóstico y una infección con TcII y TcV al momento del segundo.



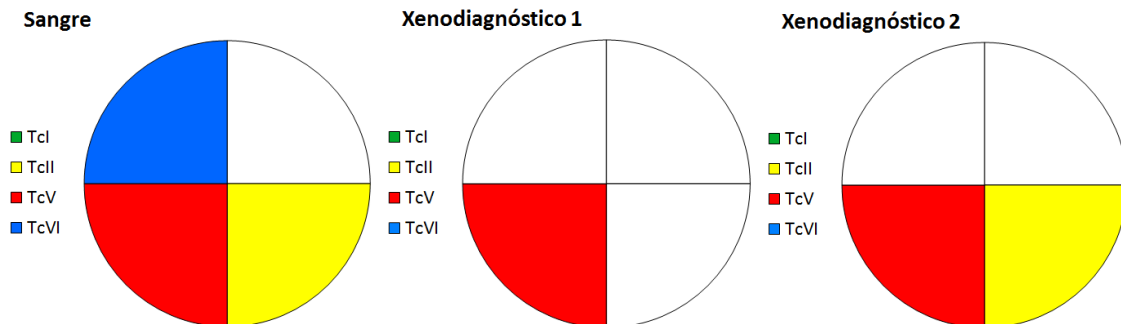
**Figura N° 3.** Variaciones en la identidad de los linajes detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para *O. degus* n° 7.

En el caso de *O. degus* n°8 se detectan los linajes TcII, TcV y TcVI en la muestra de sangre, luego es posible observar la presencia de TcI, TcII, TcV y TcVI y finalmente durante el segundo xenodiagnóstico se observa la misma combinación que se detectó en el primer análisis (TcII, TcV y TcVI).



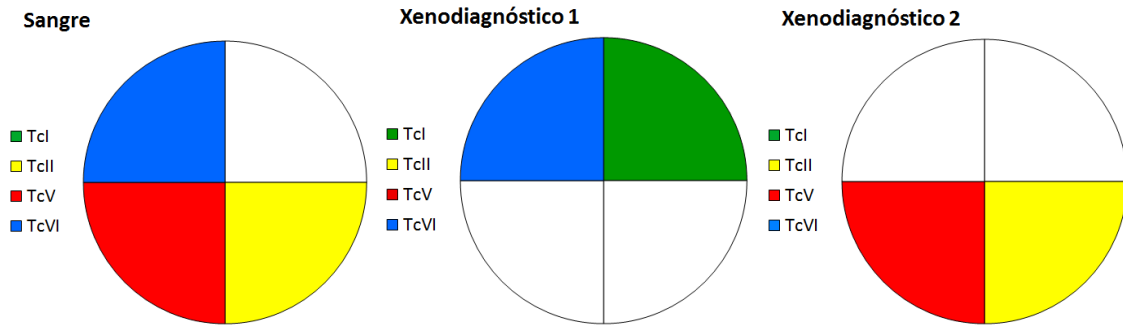
**Figura N° 4.** Variaciones en la identidad de los linajes detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para *O. degus* n° 8.

*O. degus* n°10 presentó una combinación de TcII, TcV y TcVI al análisis de la muestra de sangre, una infección única con TcV al momento del primer xenodiagnóstico y una combinación de TcII y TcV durante el segundo xenodiagnóstico.



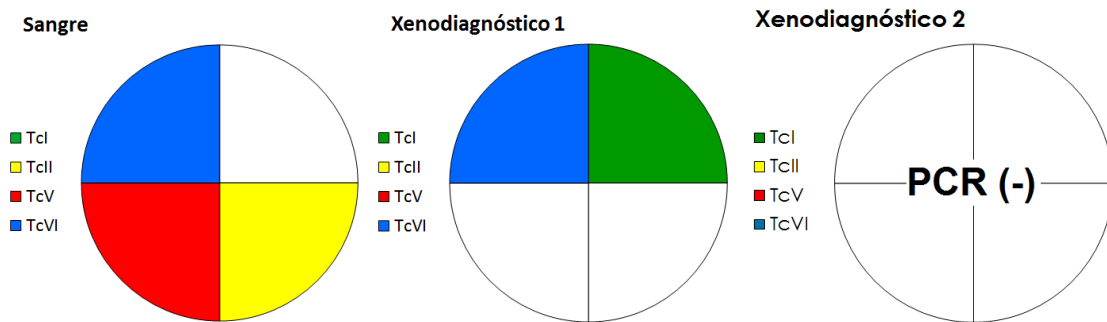
**Figura N° 5.** Variaciones en la identidad de los linajes detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para *O. degus* n° 10.

En el caso de *O. degus* n° 13 en primera instancia (muestra de sangre) se detectan los linajes TcII, TcV y TcVI, luego TcI y TcVI y en el último análisis se observan TcII y TcV.



**Figura N° 6.** Variaciones en la identidad de los linajes detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para *O. degus* n° 13.

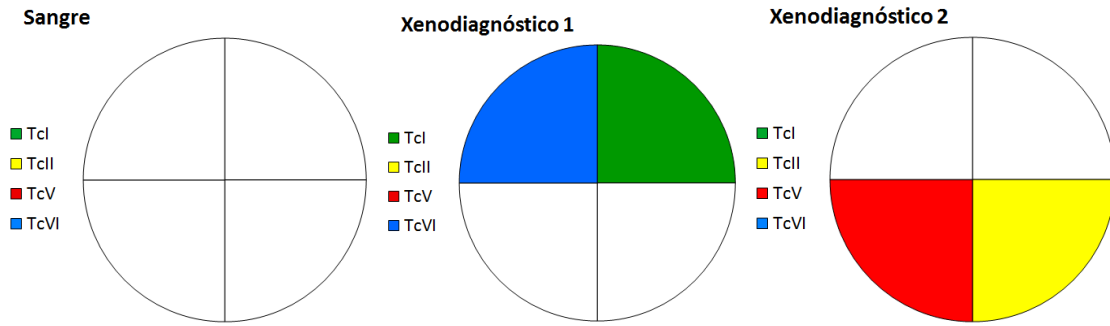
*O. degus* n° 22 presentó los linajes TcII, TcV y TcVI durante el análisis de la muestra de sangre y TcI y TcVI al primer xenodiagnóstico. No fue posible detectar la presencia de *T. cruzi* mediante ensayo de PCR durante el segundo xenodiagnóstico.



**Figura N° 7.** Variaciones en la identidad de los linajes detectados al análisis de sangre, y primer xenodiagnóstico para *O. degus* n° 22.

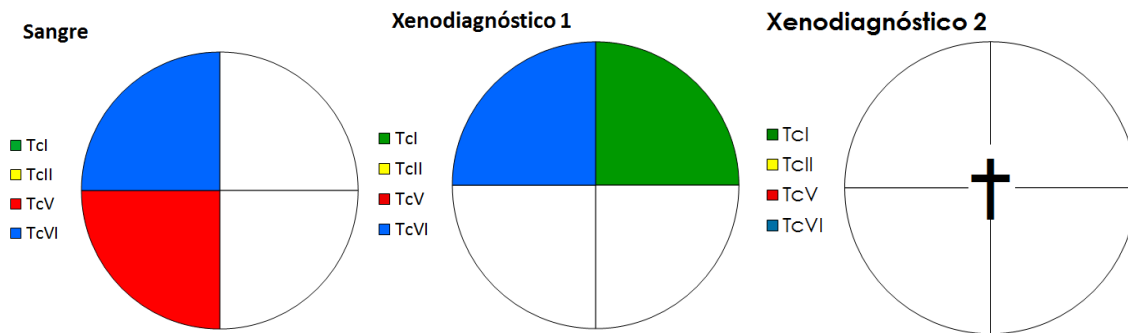
Para *O. degus* n° 27 no fue posible determinar la identidad de el o los linajes presentes en la muestra de sangre obtenida posterior a la captura, sin embargo, se detectan los linajes TcI y TcVI durante el primer xenodiagnóstico y los linajes TcII y TcV durante el segundo.





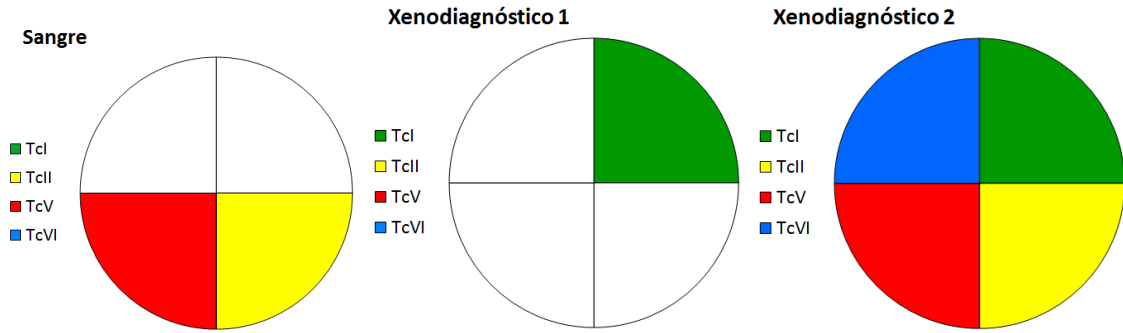
**Figura N° 8.** Variaciones en la identidad de los linajes detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para *O. degus* n° 27.

*O. degus* n° 28 presentó los linajes TcV y TcVI durante el primer análisis y los linajes TcI y TcVI durante el segundo (primer xenodiagnóstico). No fue posible realizar el segundo procedimiento de xenodiagnóstico a *O. degus* n°28 ya que fallece durante el periodo comprendido entre ambos xenodiagnósticos.



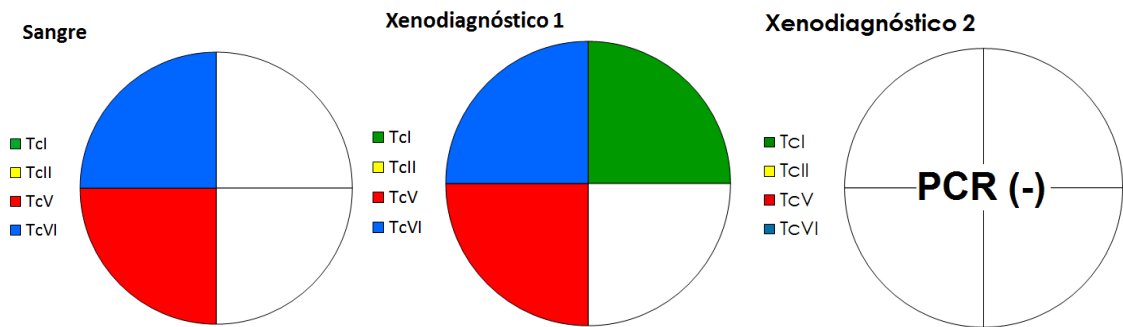
**Figura N° 9.** Variaciones en la identidad de los linajes detectados al análisis de sangre, y primer xenodiagnóstico para *O. degus* n° 28.

En el caso de *O. degus* n° 29 fue posible detectar la presencia de TcII y TcV en la muestra de sangre; TcI en las muestras provenientes del primer xenodiagnóstico y finalmente TcI, TcII, TcV y TcVI en las muestras del segundo xenodiagnóstico.



**Figura N° 10.** Variaciones en la identidad de los linajes detectados al análisis de sangre, primer y segundo xenodiagnóstico para *O. degus* n° 29.

Finalmente, *O. degus* n°30 presentó los linajes TcV y TcVI durante el primer análisis y TcI, TcV y TcVI durante el segundo. Al igual que en el caso de *O. degus* n° 22 no fue posible detectar la presencia de *T. cruzi* mediante ensayo de PCR durante el segundo xenodiagnóstico.



**Figura N° 11.** Variaciones en la identidad de los linajes detectados al análisis de sangre, y primer xenodiagnóstico para *O. degus* n° 30.

Al analizar los resultados obtenidos desde el punto de vista de la frecuencia de detección de los linajes estudiados, en los tres procedimientos diagnósticos (Tabla n° 11) es posible observar que TcI fue detectado un total de 11 veces a lo largo del estudio. Se detectó en una oportunidad al análisis de sangre, nueve veces durante el primer xenodiagnóstico y nuevamente solo una vez durante el segundo xenodiagnóstico. TcII fue detectado 15 veces en total, seis veces en el examen de sangre, una vez en el primer xenodiagnóstico y ocho veces en el segundo xenodiagnóstico. TcV fue el linaje más observado siendo detectado 19 veces, siete veces en el examen de sangre, cuatro veces en el primer

xenodiagnóstico y ocho veces en el segundo. Finalmente TcVI fue detectado 18 veces; siete veces durante el primer análisis, ocho veces durante el primer xenodiagnóstico y tres veces durante el segundo.

**Tabla N° 13.** Frecuencia de detección de linajes de *T. cruzi* en el tiempo.

	Sangre	Xenodiagnóstico 1	Xenodiagnóstico 2
TcI	1	9	1
TcII	6	1	8
TcV	7	4	8
TcVI	7	8	3

Estos resultados fueron analizados utilizando la prueba de  $\chi^2$  evidenciándose la existencia de una relación entre los linajes observados y el momento del muestreo ( $\chi^2 = 20,16$ ;  $P < 0,05$ ). Considerando que la primera detección de linajes se realizó mediante la obtención de DNA proveniente de muestras de sangre mientras que las dos detecciones siguientes fueron realizadas a partir de muestras de heces de triatomino, la prueba de  $\chi^2$  fue repetida analizando únicamente los resultados obtenidos luego de ambos xenodiagnósticos. Esto permitió descartar que el resultado previamente obtenido estuviese influenciado por la naturaleza del muestreo ya que nuevamente se detectó una relación entre los linajes observados y el momento del muestreo ( $\chi^2 = 15,39$ ;  $P < 0,05$ ).

El análisis se realizó nuevamente considerando en esta oportunidad las frecuencias de detección de los distintos linajes pero asociadas a la especie de triatomino utilizada en el xenodiagnóstico.

**Tabla N° 14.** Frecuencia de detección de linajes de *T. cruzi* en el tiempo según especie de triatomino.

		Xenodiagnóstico 1	Xenodiagnóstico 1	Xenodiagnóstico 2	Xenodiagnóstico 2
	Sangre	<i>T. infestans</i>	<i>M. gajardoi</i>	<i>T. infestans</i>	<i>M. spinolai</i>
TcI	1	3	9	1	0
TcII	6	0	1	8	7
TcV	7	1	3	8	7
TcVI	7	3	8	1	2

Al igual que en la oportunidad anterior la prueba fue aplicada en primera instancia considerando los tres procedimientos diagnósticos y en segunda instancia solamente ambos xenodiagnósticos. Los resultados obtenidos coinciden con los observados previamente ( $\chi^2 = 37,67$ ,  $P < 0,05$  para el primer análisis y  $\chi^2 = 32,63$ ,  $P < 0,05$  para el segundo) observándose una relación entre las frecuencias detectadas y el momento en que se realizó el análisis.

En la Tabla N° 15 puede observarse cuales son, al considerar la sumatoria de los resultados obtenidos luego de los tres procedimientos diagnósticos, los linajes que infectan a los roedores participantes del estudio.

**Tabla N° 15.** Linajes de *T. cruzi* detectados en los ejemplares en estudio tras tres procedimientos diagnósticos.

<i>Octodon degus</i>	Linajes detectados
<i>O. degus</i> 2	Tcl – TcII – TcV – TcVI
<i>O. degus</i> 3	Tcl – TcII – TcV – TcVI
<i>O. degus</i> 7	Tcl – TcII – TcV – TcVI
<i>O. degus</i> 8	Tcl – TcII – TcV – TcVI
<i>O. degus</i> 10	TcII – TcV – TcVI
<i>O. degus</i> 13	Tcl – TcII – TcV – TcVI
<i>O. degus</i> 22	Tcl – TcII – TcV – TcVI
<i>O. degus</i> 27	Tcl – TcII – TcV – TcVI
<i>O. degus</i> 28	Tcl – TcII – TcV – TcVI
<i>O. degus</i> 29	Tcl – TcII – TcV – TcVI
<i>O. degus</i> 30	Tcl – TcII – TcV – TcVI

Como es posible observar todos los ejemplares de *O. degus* presentaban infecciones mixtas y 10 de los 11 animales se encuentran infectados con los cuatro linajes estudiados. Únicamente un roedor (*O. degus* n° 10) se encontraba infectado con una combinación de TcII, TcV y TcVI.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Si bien los resultados obtenidos durante el primer xenodiagnóstico podrían apuntar a que las especies del género *Mepraia* poseen una mejor capacidad para amplificar a *T. cruzi* que *T. infestans* y que como consecuencia podrían considerarse como vectores más eficientes, los resultados obtenidos durante el segundo xenodiagnóstico no apoyan tal noción ya que durante este estudio *T. infestans* y *M. spinolai* fueron capaces de mostrar los mismos porcentajes de infección en sus hospederos. Adicionalmente, podría no ser posible realizar una comparación en lo que se refiere a la efectividad de las vinchucas del género *Mepraia* versus a las de la especie *T. infestans*, ya que *M. gajardoi* ha sido recientemente descrita como una especie distinta a *M. spinolai* según diferencias de cariotipo (Frias *et al.*, 1998; Botto-Mahan *et al.*, 2008).

El uso de *M. gajardoi* para diagnosticar la presencia de *T. cruzi* en el torrente sanguíneo de *O. degus* también podría ser cuestionado. *M. gajardoi* corresponde a una especie que debido a la localización de su hábitat natural no cohabita con *O. degus* ya que, como fue mencionado anteriormente, se distribuye en la costa norte de Chile entre 18° y 26°S y está asociada a nidos de aves marinas y cuevas de reptiles (Botto-Mahan *et al.*, 2008). Podría entonces *M. gajardoi* no ser el vector ideal para amplificar el o los linajes presentes en roedores cuya distribución geográfica no coincide con la del vector. Sin embargo, Botto-Mahan *et al.* (2008) reportan infecciones con TcII en un grupo de 17 ejemplares de *M. gajardoi* silvestres (Botto-Mahan *et al.*, 2008) siendo este uno de los linajes detectados por Campos *et al.* (2010) en individuos silvestres de *O. degus* (Campos *et al.*, 2010).

Al analizar la diferencia en el desempeño de *T. infestans* entre ambos xenodiagnósticos es importante considerar que durante el primer xenodiagnóstico, considerando solamente los animales que fueron analizados utilizando *M. gajardoi* y *T. infestans*, se utilizaron en promedio 2,9 triatomíneos de *T. infestans* por roedor, mientras que en el segundo xenodiagnóstico este número aumentó a 4,5 triatomíneos por *O. degus*. Este incremento en el número de vinchucas utilizadas por cada roedor se tradujo en un incremento en la cantidad de sangre extraída por cada grupo de triatomíneos (36,02  $\mu$ l a 60,57  $\mu$ l). El mayor volumen de sangre ingerida por los grupos de triatomíneos durante el segundo

xenodiagnóstico podría implicar una mayor probabilidad de que *T. infestans* como grupo sea capaz de detectar la presencia de *T. cruzi* en el torrente sanguíneo del roedor.

Las diferencias en la identidad o combinación de linajes obtenidas para un mismo *O. degus* en un mismo análisis según la especie de triatomino estudiada se asemejan al hallazgo obtenido por Campos *et al.* (2010). en el que al realizar un estudio seriado utilizando la técnica de xenodiagnóstico y dos especies de vectores distintas (*T. infestans* y *M. spinolai*) se obtuvieron diferencias en los linajes detectados según el vector para un mismo tiempo en uno de los roedores estudiados. De esta forma, durante la primera medición o tiempo 0, se detectaron los linajes TcI, TcII y TcVI en las heces provenientes de *M. spinolai* pero sólo se detectó la presencia de TcII en las heces provenientes de *T. infestans* (Campos *et al.*, 2010).

Las variaciones en la identidad de los linajes presentes en las heces de los triatominos resultan interesantes. Se ha reportado con anterioridad que el comportamiento expresado por distintos linajes de *T. cruzi* en el intestino de los vectores varía dependiendo de si éstos forman parte de una infección única o de una infección mixta (Araújo *et al.*, 2014). De esta forma, Araújo *et al.* (2014) reportan alteraciones en el comportamiento de dos linajes distintos cuando éstos deben coexistir en el intestino del vector respecto a la dinámica que los mismos linajes expresan cuando forman parte de una infección única (Araújo *et al.*, 2014).

Estas alteraciones podrían relacionarse a procesos de competencia expresados por los diferentes linajes. El fenómeno de competencia es un factor importante que determina la ecología y evolución de los distintos parásitos. Es esperable que una co-infección con distintos linajes resulte en una competencia por los recursos disponibles dentro del hospedero, afectando así el desarrollo, reproducción y sobrevivencia de los parásitos (Araújo *et al.* 2007).

Adicionalmente, no deben dejar de considerarse los efectos que el mismo vector puede ejercer sobre las poblaciones de protozoos presentes en su sistema digestivo, ya que el sistema inmune del vector es un componente esencial en la interacción entre parásito y vector. Las primeras barreras que *T. cruzi* encuentra en el intestino del vector son enzimas digestivas, factores hemolíticos y lectinas del tubo digestivo que podrían inhibir el

desarrollo de algunos linajes de parásito (Vallejo *et al.*, 2009). Otros componentes del sistema inmune de la hemolinfa del vector han sido estudiados y podrían también ayudar a inhibir el desarrollo de ciertos linajes de *T. cruzi* (Vallejo *et al.*, 2009).

Es posible entonces que las variaciones detectadas en este estudio puedan atribuirse a una combinación de las interacciones expresadas entre distintos linajes en el intestino de los vectores, y el sistema inmune de estos últimos.

En lo que respecta al alto número de resultados negativos al ensayo de PCR obtenidos durante el seguimiento realizado a los grupos de triatomíneos utilizados en ambos procedimientos de xenodiagnóstico, es importante considerar que, con la excepción de dos casos durante el segundo xenodiagnóstico, todas las muestras que entregaron resultados negativos provenían de grupos de triatomíneos que durante análisis previos o posteriores entregaron resultados positivos.

La técnica clásica de PCR dirigida a amplificar minicírculos puede detectar parásitos a un nivel mínimo de 0,25 equivalentes de un genoma de parásito por mililitro, lo que corresponde a la sensibilidad de detección del ensayo (Botto-Mahan *et al.*, 2012). Es por ello que no se debe descartar la posibilidad de que la prueba de PCR no haya sido capaz de detectar la presencia de parásitos en las heces de los insectos debido a que éstos se encontraban en una cantidad menor a la indicada.

Al realizar un estudio sobre las dinámicas expresadas por TcI y TcII en infecciones experimentales únicas versus infecciones mixtas en *Rodnius prolixus*, Araújo *et al.* (2014) detectaron la presencia del parásito en el intestino del vector utilizando la técnica de PCR mini exón. Los investigadores mencionan que para lograr que la técnica fuese efectiva las muestras de DNA genómico obtenidas debieron ser concentradas 10 veces. Si bien la técnica de PCR utilizada en dicho trabajo no es la misma que se utilizó en el presente estudio se decidió intentar, hasta cierto punto, repetir la experiencia utilizando el material obtenido tras las purificaciones realizadas a las heces de los triatomíneos. Esto con el objetivo de descartar que los resultados de PCR negativos pudiesen estar asociados a la ausencia del protozoo en lugar de a una baja carga parasitaria en las heces. Como se mencionó en la sección de materiales y métodos se procedió a aumentar la cantidad potencial de DNA disponible al mezclar el material obtenido luego de dos purificaciones y

luego concentrar dicha mezcla al evaporar el agua presente en ella hasta obtener 50 µl. Este procedimiento permitió obtener resultados positivos para seis de las 10 muestras tratadas. Resultaría interesante repetir esta experiencia con todas las muestras para las cuales se obtuvieron resultados negativos.

En lo que se refiere a la detección de variaciones temporales en la presentación sanguínea de los distintos linajes de *T. cruzi* estudiados los resultados observados coinciden con los obtenidos por Campos *et al.* (2010) que reportan que *O. degus* puede presentar fluctuaciones temporales con distintos linajes de *T. cruzi*. El análisis de las frecuencias de detección de los distintos linajes en el tiempo reveló una asociación entre las frecuencias detectadas y el momento de muestreo. Esto podría indicar que la detección de un determinado linaje o linajes depende del momento en que se examine la presencia de estos en la sangre de los roedores infectados.

Las fluctuaciones detectadas podrían estar asociadas a los cambios de proporciones relativas de la carga parasitaria de distintos linajes en la sangre periférica (Campos *et al.*, 2010). La existencia de fluctuaciones temporales podría ser explicada por la colonización de distintos tejidos con *T. cruzi* descrita en pacientes y animales infectados experimentalmente que presentan daño a sus órganos. Dicha colonización implica la liberación de *T. cruzi* al sistema vascular, permitiendo que estos parásitos luego colonicen otros tejidos. Concomitantemente, la infección es controlada por el sistema inmune del hospedero. Ambos procesos podrían alcanzar un equilibrio y explicar la parasitemia observada en pacientes inmunocompetentes en la fase crónica de la enfermedad de Chagas (Campos *et al.*, 2010).

En lo que concierne a los dos ejemplares de *O. degus* para los cuales no fue posible detectar resultados positivos durante el segundo xenodiagnóstico, es posible que, como se menciona anteriormente, los roedores hayan presentado parasitemias por debajo del nivel de detección. Una baja parasitemia podría haber redundado en que, o bien los triatomíneos no ingirieron ningún protozoo, o la cantidad ingerida no fue suficiente para luego ser detectada en las heces por la prueba estándar de PCR.



Uno de los factores importantes a considerar en el caso de los roedores participantes del estudio longitudinal es el estrés. La respuesta crónica al estrés está relacionada al sistema hipotálamo-hipófisis-adrenal, el cual estimula la producción de glucocorticoides por parte de la médula adrenal. Los glucocorticoides poseen un potente efecto inmunosupresor y linfólítico y disminuyen la producción de anticuerpos. De esta forma inducen una disminución en la resistencia del individuo a diferentes patologías y pueden también causar la activación de enfermedades latentes (Cano, 2008). Los ejemplares de *O. degus* utilizados en este estudio corresponden a animales silvestres que fueron extraídos de su entorno natural para luego ser mantenidos en condiciones de cautiverio. El estrés producido por esta situación podría haber alterado la competencia del sistema inmune de los roedores aumentando los niveles de parasitemia.

A modo de ejemplo se puede mencionar la experiencia descrita por Cano (2008) en la que se buscó determinar la respuesta sistémica de *O. degus* a la picada de *M. spinolai*. Para ello se realizaron mediciones basales entre otros parámetros, los niveles de cortisol, detectándose que en *O. degus* mantenidos en cautiverio estos niveles alcanzaban un promedio de 3314,4 nmol/l, valores superiores a los obtenidos por otros autores (828 nmol/l). Al no distinguirse variaciones significativas en los niveles de cortisol luego de que los roedores fuesen picados por triatominos, el autor atribuye dichos niveles a variables propias de la mantención en cautiverio de los roedores, variables que también podrían ser aplicadas a los roedores participantes de este estudio. No sería extraño entonces que, a medida que los roedores experimentaron un proceso de acostumbramiento a las condiciones de cautiverio, sus niveles de cortisol descendiesen mejorando de esa forma la competencia de su sistema inmune estableciendo así un nuevo equilibrio con las poblaciones de *T. cruzi* presentes en su organismo, lo que podría traducirse en una disminución de las parasitemias. De esta forma, la detección de *T. cruzi* en la sangre de los ejemplares en estudio podría haber sido más sencilla durante el primer xenodiagnóstico ya que este se realizó en promedio 4,5 meses luego de la captura de los roedores, mientras que el segundo xenodiagnóstico ocurrió en promedio 10,5 meses posterior a la captura.

Existen diversas alternativas que permitirían disminuir el efecto que la mantención y manejo en cautiverio ejerce sobre estos roedores. Una de ellas sería por ejemplo, repetir estos experimentos utilizando ejemplares de *O. degus* de laboratorio que se encuentren

acostumbrados al manejo humano. Otra opción sería evaluar la presencia de los distintos linajes de *T. cruzi* en *O. degus* silvestres mediante el método de captura-recaptura.

Es importante recordar que los diferentes linajes de *T. cruzi* presentan diferente tropismo por distintos tejidos y pueden coexistir en distintos tejidos de un mismo individuo al mismo tiempo. Es por ello que la caracterización de parásitos desde el torrente sanguíneo podría subestimar la complejidad de las poblaciones de parásito infectante (Buscaglia y Di Noia, 2003).

Como conclusiones es posible mencionar que las interacciones establecidas por *T. cruzi* y sus vectores y hospederos mamíferos deben ser consideradas cuando se busca determinar la presencia de los distintos linajes en la sangre de estos últimos.

Dada la obtención de distintos resultados dependiendo de la especie de triatmino utilizada, y la existencia de variaciones temporales en la detección de distintos linajes en las heces de los vectores, es que, a la hora de utilizar la técnica de xenodiagnóstico como método para caracterizar las distintas poblaciones de *T. cruzi* que se encuentran infectado a un mamífero, debe tenerse en cuenta que el efecto que estos insectos ejercen sobre los protozoos que ingieren podría conllevar a la subestimación de las poblaciones de *T. cruzi* presentes en el mamífero.

Adicionalmente, fue posible comprobar que, como ha sido evidenciado por otros autores previamente, las distintas poblaciones de parásito de *T. cruzi* pareciesen expresar fluctuaciones temporales en la sangre periférica de *O. degus*, lo que también podría llevar a subestimar las poblaciones presentes en un individuo en caso de realizar únicamente un análisis. Es por ello que los resultados encontrados en este trabajo recalcan la importancia de realizar estudios seriados cuando se busca determinar la identidad de linajes de *T. cruzi* infectando tanto a vectores como a mamíferos, ya que la detección y caracterización de los distintos linajes de *T. cruzi* parece variar en el tiempo.

## BIBLIOGRAFÍA

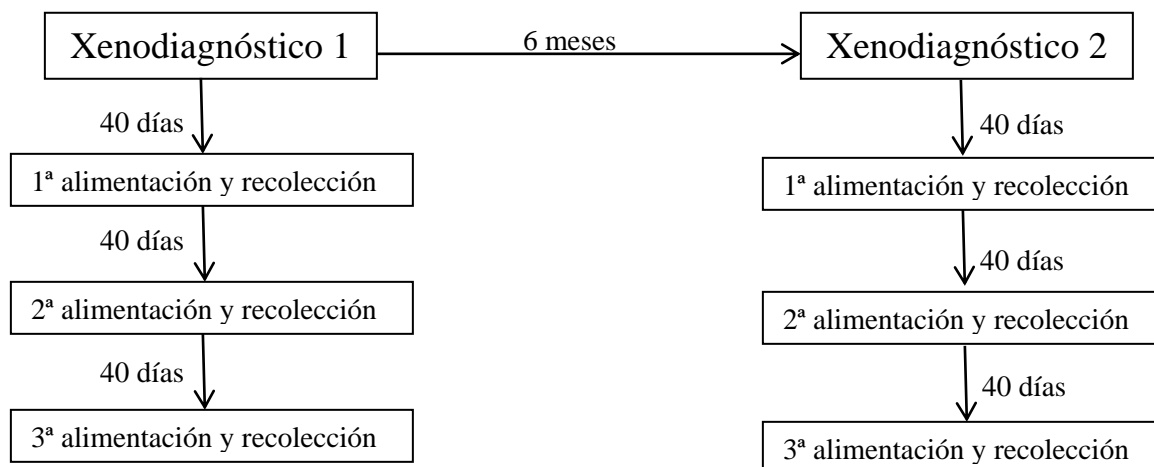
- **ARAÚJO, C.; CABELLO, P.; JANSEN, A.** 2007. Growth behaviour of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: *In vitro* and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis*. *Acta Trop.* 101(3):225-231.
- **ARAÚJO, C.; WANIEK, P.J.; JENSEN, A.M.** 2014. TcI/TcII co-infection can enhance *Trypanosoma cruzi* growth in *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors.* 7:94-104.
- **ATÍAS, A.** 1998. Enfermedad de Chagas. Triatomas, Chinchas y Cucarachas. In: *Parasitología Médica*. Editorial Mediterráneo. Santiago, Chile. pp. 251-264; 477-483.
- **BACIGALUPO, A.; SEGOVIA, A.; GARCÍA, A.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.; ACUNA-RETAMAR, M.; TORREZ-PÉREZ, F.; CATTAN, P.** 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.
- **BOTTO-MAHAN, C.; BACIGALUPO, A.; CORREA, J.; ODA, E.; SOLARI, A.** 2012. *Acta Trop.* 122(1):164-167.
- **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.
- **BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN, P.E.; CANALS, M.; ACUÑA, M.** 2005. Seasonal variation in the home range and host availability of the blood-sucking insect *Mepraia spinolai* in wild environment. *Acta Trop.* 95(2):160-163.
- **BOTTO-MAHAN, C.; SEPÚLVEDA, 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(2):166-169.
- **BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M.** 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int. J. Parasitol.* 31(12):18-26.
- **BUSCAGALIA, C.; DI NOIA, J.** 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes Infect.* 5:419-427.
- **CAMPOS, R.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ACUÑA, M.; CATTAN, P.; SOLARI, A.** 2007. Short report: *trypanosoma cruzi* detection in blood by xenodiagnosis and polymerase chain reaction in the wild rodent *Octodon degus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76(2):324-326.

- **CAMPOS, R.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; CORONADO, X.; SOLARI, A.** 2010. Short Report: Temporal Fluctuation of Infection with Different *Trypanosoma cruzi* Genotypes in the Wild Rodent *Octodon degus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83(2):380-381.
- **CANO, C.** 2008. Respuesta sistémica del roedor *Octodon degus* frente a la picada del vector silvestre de la enfermedad de Chagas, *Mepraia Spinolai*. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.
- **FREDES, F.** 2010. Tripanosomiasis Americana. Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias, Dpto. Medicina Preventiva Animal. pp. 77-81.
- **FRÍAS, D.** 2010. A New Species and Karyotype Variation in the Bordering Distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardo* Frías *et al* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its Parapatric Model of Speciation. *Neotrop. Entomol.* 39(4): 572-583.
- **FRÍAS, D.; HENRY, A.; GONZALEZ, C.** 1998. *Mepraia gajardo* una nueva especie de triatominae (Hemiptera: Reduviidae) para Chile y su comparación con *Mepraia spinolai* (Porter, 1934). *Rev. Chil. His. Nat.* 71:177-188.
- **GUHL, F.** 2013. Epidemiología Molecular de *Trypanosoma cruzi*. **In:** IX Taller sobre la Enfermedad de Chagas. Barcelona, España. 4 marzo 2013. *Rev. Esp. Salud Pública.* pp. 1-8.
- **NOIREAU, F.; DOISQUE, P.; JANSEN, A.M.** 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vector and its hosts. *Vet. Res.* 40(2):26.
- **ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.; SOLARI, A.** 2005. Short report: *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals from a chagasic area of chile . *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):647-653.
- **SCHENONE, H.; ROJAS, A.; CASTILLO, D.** 2000. Estudio comparativo de la sensibilidad y mortalidad de las ninfas III y IV de *Triatoma infestans* usadas en el xenodiagnóstico de pacientes crónicos. *Bol. Chil. Parasitol.* 55(1-2):14-17.
- **SIMPSON, L.** 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastprotozoa: genomic organization, transciption; replication and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:363-382.
- **SOKAL, R.; ROHLF, F.** 1995. Biometry. **In:** The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. WH Freeman & Company,New York.
- **STURN, N.; SIMPSON, L.** 1990. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell.* 61(5):879-884.

- **TORRES-PÉREZ, F.; ACUNA-RETAMAR, M.; COOK, J.A.; BACIGALUPO, A.; GARCÍA, A.; CATTAN, P.** 2010. Statistical phylogeography of Chagas disease vector *Triatoma infestans*: Testing biogeographic hypotheses of dispersal. *Infect. Genet. Evol.* 11(1):167-174.
- **VALLEJO, G.; GUHL, F.; CARRANZA, J.; HERRERA, C.; URREA, D.; FALLA, A.; ZABALA, D.; VILLA, L.** 2009. *Trypanosoma cruzi* population variability in Colombia: posible co-evolution in different vector species. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42(2): 27-34.
- **WESTENBERGER, S.; BARNABE, C.; CAMPBELL, D.; STURN, N.** 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics.* 171(2):527-543.
- **WHO.** 2013. [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>> [consulta: 25-04-2013].
- **ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURN, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G.** 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104(7):1051-1054.

## ANEXOS

**Anexo N° 1:** Planificación xenodiagnósticos y alimentaciones posteriores de triatominos.



**Anexo N° 2.** Prueba de T aplicada a  $\mu$ l de sangre ingeridos por *M. gajardo* (variable 1) y *T. infestans* (variable 2) durante el primer xenodiagnóstico.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	Variable 1	Variable 2
Media	10,42	12,42
Varianza	16,56	20,26
Observaciones	11,00	8,00
Diferencia hipotética de las medias	0,00	
Grados de libertad	14,00	
Estadístico t	-0,99	
P(T<=t) dos colas	0,34	
Valor crítico de t (dos colas)	2,14	

**Anexo N° 3.** Prueba de T aplicada a  $\mu$ l de sangre ingeridos por *M. spinolai* (variable 1) y *T. infestans* (variable 2) durante el segundo xenodiagnóstico.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	22,16	12,79
Varianza	16,29	21,47
Observaciones	10,00	10,00
Diferencia hipotética de las medias	0,00	
Grados de libertad	18,00	
Estadístico t	4,82	
P(T<=t) dos colas	0,00014	
Valor crítico de t (dos colas)	2,10	

**Anexo N° 4.** Prueba de T aplicada a  $\mu$ l de sangre ingeridos por *M. gajardoi* (variable 1) y *M. spinolai* (variable 2) en ambos xenodiagnóstico.

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	10,42	22,16
Varianza	16,56	16,29
Observaciones	11,00	10,00
Diferencia hipotética de las medias	0,00	
Grados de libertad	19,00	
Estadístico t	-6,63	
P(T<=t) dos colas	0,0000024	
Valor crítico de t (dos colas)	2,09	

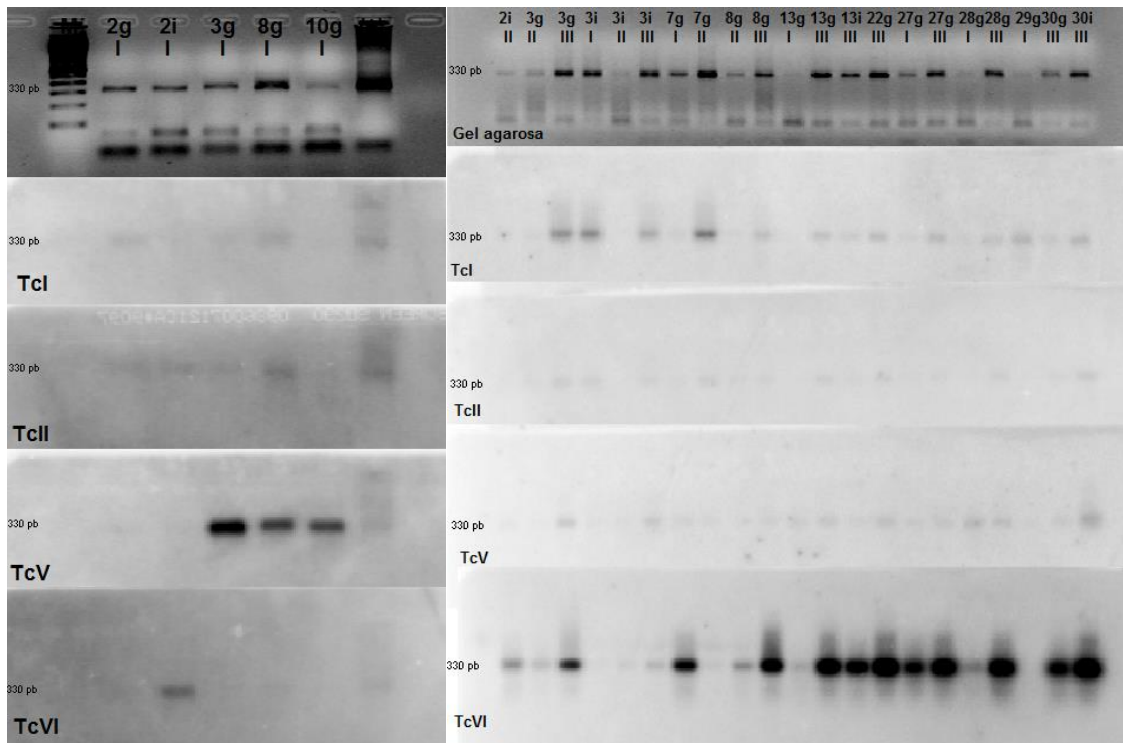
**Anexo N° 5.** Prueba de T aplicada a  $\mu$ l de sangre ingeridos por *T. infestans* durante el primer xenodiagnóstico (variable 1) y *T. infestans* durante el segundo xenodiagnóstico (variable 2).

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	12,42	12,79
Varianza	20,26	21,47
Observaciones	8,00	10,00
Diferencia hipotética de las medias	0,00	
Grados de libertad	15,00	
Estadístico t	-0,17	
P(T<=t) dos colas	0,86	
Valor crítico de t (dos colas)	2,13	



**Anexo n° 6:** Resultados genotipificación primer xenodiagnóstico. El número indica la identidad del roedor. La letra “g” indica muestras provenientes de *M. gajardoi*, la letra “i” indica muestras provenientes de *T. infestans*. El número “I” indica muestras provenientes del primer análisis post xenodiagnóstico (40 días), el número “II” indica muestras provenientes del segundo análisis post xenodiagnóstico (80 días), y el número “III” indica muestras provenientes del tercer análisis (día 120).



**Anexo n° 7:** Resultados genotipificación segundo xenodiagnóstico. El número indica la identidad del roedor. La letra “s” indica muestras provenientes de *M. spinolai*, la letra “i” indica muestras provenientes de *T. infestans*. El número “I” indica muestras provenientes del primer análisis post xenodiagnóstico (40 días) y el número “II” indica muestras provenientes del segundo análisis post xenodiagnóstico (80 días).

