



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE *Trypanosoma cruzi*  
EN INSECTOS VECTORES SILVESTRES  
DEL GÉNERO *Mepraia*

**ANDREA TOLEDO CORRALES**

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

**PROFESORA GUÍA: ALDO SOLARI ILLESCAS**

**SANTIAGO, CHILE**  
2013

MEMORIA DE TÍTULO

**“DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE *Trypanosoma cruzi* EN INSECTOS**

**VECTORES SILVESTRES DEL GÉNERO *Mepraia*”.**

**Andrea Toledo Corrales \*°**

\*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

°Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos, Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas, zoonosis ampliamente difundida en América, es causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. En su transmisión participan animales vertebrados y artrópodos hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae. En Chile, el aumento de las interacciones humano-fauna silvestre han permitido que emerja como amenaza la transmisión al ser humano desde los triatominos silvestres *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi*. En este estudio se investigaron los niveles de infección por *T. cruzi* en vectores del género *Mepraia* de localidades silvestres cercanas a Arica, Iquique e Illapel, a través de amplificación del DNA del kinetoplasto, obteniendo un 51% de infección en 75 ejemplares de *M. spinolai* y un 18% en 244 de *M. gajardoi*. Luego se realizó la genotipificación de *T. cruzi*, definiendo el tipo de *T. cruzi* infectante (TcI, TcII, TcV, TcVI) con sondas de minicírculos que provienen de los *T. cruzi* indicados. Los genotipos detectados corresponden a los cuatro tipos de *T. cruzi* mencionados, existiendo algunas infecciones mixtas. Los resultados muestran que, los triatominos *M. spinolai* y *M. gajardoi*, presentan una diversidad de *T. cruzi*, con distintos porcentajes de infección, según donde habiten y sus fuentes de alimentación.

**Palabras claves:** Enfermedad de Chagas, *Mepraia* sp., Genotipos de *T. cruzi*.

## ABSTRACT

Chagas disease, a widespread zoonosis in America, is caused by the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. In its transmission participates vertebrate animals and blood-sucking arthropods belonging to the subfamily Triatominae. In Chile, an increased human- wildlife interaction has allowed the emergence of a threat to humans by parasite transmission from wild triatomines *Mepraia spinolai* and *Mepraia gajardoi*. This study investigated the levels of *T. cruzi* infection in vectors from the *Mepraia* genus of sylvatic localities nearby Arica, Iquique and Illapel, through amplification of DNA kinetoplast, obtaining 51% of infection in 75 specimens of *M. spinolai* and 18% in 244 *M. gajardoi*.

*T. cruzi* genotyping was then performed, identifying the type of *T. cruzi* infecting (TcI, TcII, TcV, TcVI) with minicircle probes originated from the *T. cruzi* mentioned. The genotypes detected correspond to the four types of *T. cruzi* appointed, there are some mixed infections. The results show that the triatomines *M. spinolai* and *M. gajardoi* present a diversity of *T. cruzi* genotypes, with varying degrees of infection depending on habitat and food sources.

**Keywords:** Chagas disease, *Mepraia* sp., *T. cruzi* of genotypes.

## INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana es una zoonosis parasitaria que se encuentra en el continente americano desde hace más de 9.000 años, constituyéndose como una amenaza permanente para la población de América Latina. Actualmente está ampliamente difundida, pudiendo observarse en toda América del Sur, Centroamérica, México y el sur de California, en donde habitan los vectores biológicos. Sin embargo, el éxodo de miles de latinoamericanos a otros continentes, la ha llevado a países donde no se había considerado antes su diagnóstico, transformándose en los últimos años, en una enfermedad emergente (1, 22).

La infección chagásica es producida por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, que se caracteriza por utilizar en su cadena de transmisión dos hospederos, uno invertebrado, que corresponde a un grupo de insectos vectores hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae y otro vertebrado, compuesto por el ser humano y al menos 155 especies de animales domésticos, silvestres y sinantrópicos. Según el hospedero en que se encuentre, puede presentar tres estadios morfológicos: tripomastigote, epimastigote y amastigote (3).

El ciclo biológico de la enfermedad comienza cuando los triatominos consumen sangre de un mamífero que contiene tripomastigotes, los cuales se multiplican activamente como epimastigotes en el intestino medio del insecto. Al cabo de 15 a 30 días, se eliminan en forma de tripomastigotes metacíclicos, a través de deyecciones emitidas por el triatomino infectado en el momento de picar a un nuevo mamífero. Las formas tripomastigotes infectantes ingresan atravesando la piel por el sitio de la picadura, por vía oral o a través de las mucosas, hasta penetrar en las células del hospedero vertebrado. Dentro de éstas, los tripomastigotes pierden su flagelo y se diferencian para formar amastigotes los cuales se multiplican intracelularmente hasta destruirlas, liberando los parásitos a la circulación e invadiendo otras células. El ciclo se cierra cuando un triatomino no infectado se alimenta de un animal con tripomastigotes circulando (3, 7).

*T. cruzi* pertenece al orden *Kinetoplastida*, por lo que a diferencia de otros protozoarios, se caracteriza por la presencia de una gran mitocondria o kinetoplasto (red compleja de miles de moléculas de DNA circular localizadas y concatenadas en su única mitocondria). El DNA kinetoplastídico, representa alrededor del 20% del DNA celular y está compuesto por dos tipos de moléculas, los maxicírculos y los minicírculos (27). Los primeros (20.000

pares de bases; 50 copias por célula) codifican para proteínas de la cadena de transporte de electrones y RNA ribosómico mitocondrial, mientras que los minicírculos (1.400 pares de bases; 10.000 a 20.000 copias por célula) codifican para pequeños RNAs (RNA guías) que participan del proceso de edición de los transcritos de los maxicírculos, estando compuestos por cuatro regiones constantes y cuatro zonas hipervariables que se ubican intercaladas entre sí, siendo éstas últimas, las que presentan una alta tasa de mutación, confiriéndole una gran diversidad a los diferentes genotipos de *T. cruzi* (7).

Este parásito es clasificado como una sola especie, a pesar de la considerable variabilidad genética entre los distintos aislados realizados (31). La explicación para esto reside en el hecho que *T. cruzi* se multiplica predominantemente por división binaria, por lo que el genoma de cada linaje evoluciona de manera independiente otorgándole una estructura clonal. No obstante, estudios basados en la secuenciación de diversos loci, tanto del genoma nuclear como mitocondrial, permitieron postular que *T. cruzi* tiene la capacidad de realizar recombinación genética, evidenciada por la existencia de varios genotipos con características híbridas (18, 32). De esta manera, mediante técnicas de electroforesis, las poblaciones del parásito fueron reunidas inicialmente en tres grupos, denominados zimodemos Z1, Z2 y Z3. Investigaciones posteriores, los clasificaron en dos linajes filogenéticos llamados *T. cruzi* I (Tcl) y *T. cruzi* II (TcII), siendo el segundo linaje subdividido en TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcII d y TcIIe. Según esto, Z1, Z2 y Z3, corresponderían a Tcl, TcIIb y TcIIa respectivamente, mientras que los subgrupos TcIIc, TcII d y TcIIe son genotipos híbridos generados por fenómenos de recombinación entre Tcl con TcIIb y TcIIb con TcIIc, respectivamente (32). Tiempo después, la comunidad científica reagrupó a las poblaciones de *T. cruzi* en seis diferentes "Unidades Discretas de Tipificación" o UDTs (DTU, "Discrete Typing Units"), en donde cada Unidad correspondería a grupos de *T. cruzi* que están más estrechamente relacionados entre sí que con otros conjuntos, cuando son definidas por marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos (33). A su vez, éstas se separan en dos grandes subdivisiones, llamadas DTU I y DTU II, siendo además el DTU II subdividido en 5 DTUs, IIa-e. Finalmente, un comité de expertos determinó que la nomenclatura actual para los genotipos de *T. cruzi*, los clasificaría en 6 linajes, desde *T. cruzi* I al VI (33).

En América se han descrito 116 especies de triatomíneos vectores de *T. cruzi*, las cuales pertenecen al Orden Hemiptera, Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae, agrupados en 14 géneros (26). En Chile, podemos encontrar cuatro especies de triatomíneos. Una de ellas es *T. infestans*, la cual se extendía históricamente entre los paralelos 18°30' y 34°36'

de latitud sur, es decir, en los ambientes domésticos y peridomésticos de las zonas rurales entre las regiones de Arica-Parinacota y del Libertador Bernardo O'higgins. Las otras tres especies, todas endémicas y asociadas a hábitat silvestres, corresponden a *M. gajardoi*, *M. spinolai*, y *M. parapatrica*. La primera, descrita en 1998, se distribuye en la franja costera de las regiones de Arica y Parinacota y de Antofagasta, entre los paralelos 18° y 26° latitud sur, donde se encuentra asociada a zonas rocosas cerca de nidos de aves marinas y de cuevas de reptiles, siendo posible también colectarla en caletas de pescadores a la orilla del mar, hasta el borde de la Región de Atacama (12). *M. spinolai*, en tanto, se detecta desde la Región de Atacama hasta la Región Metropolitana, entre los paralelos 26° y 34° latitud sur distribuyéndose por la costa hasta la Región de Coquimbo y también al interior de los valles y precordillera de los Andes donde es posible encontrarla a una altitud de 3.000 metros sobre el nivel del mar. Se puede encontrar entre las piedras, cobijándose en las grietas de rocas, en guaneras y nidos de aves, en cuevas de diversos animales y en asociación con pequeños mamíferos, tales como conejos, chinchillas, vizcachas, zorros, marsupiales, roedores, lagartijas y culebras (10), hallándose también en el peridomicilio (en el interior de corrales de animales domésticos) e incluso ser identificada ocasionalmente en viviendas rurales (16, 23). En el caso de *M. parapatrica*, recientemente descrita en 2010, ésta se distribuye en la Región de Atacama entre los 25° y 26°S (14). En esta zona geográfica existe un conflicto taxonómico, ya que según lo observado en un reciente estudio, los insectos provenientes de estas zonas limítrofes (Región de Antofagasta) se agrupan con la línea evolutiva de *M. spinolai* a través de marcadores nucleares, pero con marcadores mitocondriales estos ejemplares se agrupan con la línea de *M. gajardoi* (9). La hipótesis más reciente señala a través de caracteres morfológicos y de cariotipos que en estas zonas se distribuye esta nueva especie (14).

A principios de 1960, comenzaron las primeras iniciativas de control en áreas rurales y suburbanas de Santiago, Chile, resultado del trabajo conjunto entre la Universidad de Chile y el Ministerio de Salud. Estas intervenciones tuvieron resultados limitados, debido a la discontinuidad de recursos. Posteriormente, en la década del '80, comenzaron acciones institucionales de control más estructuradas, pero también limitadas en disponibilidad de recursos y cobertura (21). Fue sólo en 1991, con la incorporación de Chile a la Iniciativa de los países del Cono Sur, INCOSUR-Chagas, que se logró intensificar y ampliar el programa de control a toda el área de distribución del principal vector de la enfermedad (*T. infestans*), además de una adecuada cobertura de tamizaje de los bancos de sangre, y de la entrega de información a la población sobre los mecanismos de transmisión,

síntomas de la enfermedad, lugares de refugio del vector y características de su biología, buscando de esta manera, que se denunciara oportunamente la detección de insectos en las habitaciones humanas. Con estas medidas se consiguió disminuir a valores residuales, los niveles de infestación por *T. infestans*, interrumpiendo la transmisión vectorial, situación que fue certificada por una Comisión *ad-hoc* de la Iniciativa en el año 1999 (21). Entre los fundamentos de la certificación, ese año se registró sólo un 0.2% de infestación domiciliaria por *T. infestans*, con una baja densidad de ejemplares por vivienda, un bajo índice de infección natural por *T. cruzi* en el vector, así como la ausencia de casos atribuibles a transmisión vectorial de *T. cruzi*, a través de estudios serológicos en niños (17).

El nicho otrora ocupado por *T. infestans*, quedaba libre ahora para la posible llegada de triatomíneos silvestres desde su hábitat natural. Teniendo en cuenta que en ese entonces ya existían antecedentes de este hecho en otros países latinoamericanos (13), la necesidad de implementar programas de monitoreo de los vectores silvestres, que permitieran establecer su importancia epidemiológica, se hacía indispensable. Sin embargo, sólo se ha encontrado de forma excepcional a *T. spinolai* en viviendas humanas, sin constituir hasta ahora un comportamiento habitual en este vector (23). En el caso de *M. gajardoi* y *M. parapatrica*, no existen informes que las ubiquen en habitaciones humanas. Lo que sí se ha podido observar a través del programa de vigilancia epidemiológica vigente, es la presencia de focos silvestres de *T. infestans* asociados a matorrales en la Región Metropolitana y la Región de Valparaíso (4, 5). Sin duda establecer el panorama actual de la infección chagásica es imprescindible.

El objetivo del presente estudio es detectar la presencia de *T. cruzi* que circula en insectos silvestres pertenecientes al género *Mepraia*, capturados en distintas localidades del norte-centro de nuestro país. Un segundo objetivo es genotipificar las poblaciones de *T. cruzi* con el análisis de "DNA blotting", utilizando sondas de kDNA genotipo específicas y posteriores ensayos de hidridación.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Población en estudio**

Los 75 ejemplares de *M. spinolai* analizados, provienen de un sector llamado El Bolsico, ubicado al interior de la Reserva Nacional Las Chinchillas, Región de Coquimbo, Chile (31° 30' 28" S, 71° 06' 19" O). Mientras que los 170 insectos de *M. gajardoi*, fueron

capturados en las localidades costeras de Caleta Camarones, Caleta Vitor y Playa Corazones (Figura 1a y b), pertenecientes a la Región de Arica y Parinacota (Zona Costera Silvestre, sitio1; 18°28'47"S, 70°16'08"O). Conjuntamente, se recolectaron en la Región de Tarapacá, desde el sector de Río Seco y San Marcos (Figura 1a y c), 74 ejemplares (Zona Costera Periurbana, sitio 2; 21°00'06" S, 70°07'30" O).

Los insectos obtenidos se mantuvieron en forma individual en una cámara incubadora con condiciones óptimas de crecimiento (27° C, 75% humedad relativa, fotoperiodo de 14 hrs luz y 10 hrs de oscuridad), perteneciente al Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Posteriormente, en este lugar, se les alimentó con roedores de laboratorio (*Mus musculus*), tomando luego muestras de sus heces. En el caso de aquellos ejemplares que murieron durante el traslado o durante el cautiverio en el laboratorio, se les realizó la extracción del contenido intestinal. Cada muestra obtenida y debidamente identificada se diluyó con 100 ml agua bidestilada y se almacenó a -20°C, logrando una adecuada conservación del DNA del parásito (29).

## **2. Detección de kDNA de *T. cruzi* por la reacción en cadena de la polimerasa**

Para la detección de kDNA de *T. cruzi* mediante "la reacción en cadena de la polimerasa" (PCR), se descongelaron las muestras de heces diluidas y se hirvieron por 15 min. A continuación, se centrifugaron por 30 s a 10.000 x g, realizándose luego una cromatografía de exclusión molecular para remover inhibidores de bajo peso molecular. Esta se hizo aplicando 50uL de cada muestra en columnas de 3 mL, las cuales contenían 0,5 mL de resina en agua destilada (Bio-Gel P-6 Gel Medium, Bio-Rad), obteniendo así una muestra limpia. En seguida, se llevó a cabo la amplificación de las regiones hipervariables de los minicírculos del DNA kinetoplastídico, utilizando un termociclador Techne® TC-512. La mezcla de la reacción de amplificación estaba constituida por 5µL de la muestra, 3µL de los oligonucleótidos 121(5'- AAA TAA TGT ACG GGG GAG ATG CAT GA-3') y 122 (5'- GTT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA -3'), que se alinean a la región constante, a una concentración de 25 µM, 5µL de amortiguador de Taq polimerasa, que contiene también concentraciones finales de 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. El amortiguador contiene además 0,5 µL de BSA 1%, 5 µL (0,4mM) de los dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), cuatro unidades de Taq polimerasa (0,5 µL) y agua bidestilada hasta un volumen final de 50 µL. La amplificación del kDNA de *T. cruzi* constó de 35 ciclos de 45 s de denaturación a 94°C, 45 s de alineamiento a 58°C y 45 s de extensión a 72°C. El programa se inició

con una partida en caliente de diez min y finalizó con una extensión final de siete min a 78°C. En cada experimento se usó un control positivo para *T. cruzi* y un control de PCR donde el DNA de la muestras fue reemplazado por agua destilada. Finalizado el ensayo se tomaron 10 uL del amplificado y se mezclaron con 4 uL de amortiguador de carga, al igual que ambos controles, mientras que del marcador de tamaño molecular (DNA en escalera de 100 pares de bases) se ocuparon 2 uL con 3 uL de amortiguador de carga.

Para la visualización del producto amplificado que tiene un tamaño de 330 pares de bases, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio, y se observó en un transiluminador Hoefer UVC500 con filtro de luz ultravioleta. El resultado se consideró positivo al observar una única banda al mismo nivel de la banda de 330 pares de bases del marcador, ya que indicó la presencia de kDNA de *T. cruzi* (5).

#### **4. Genotipificación de *T. cruzi***

Para tipificar los genotipos de *T. cruzi* se realizó la transferencia del DNA a membranas por simple difusión, partiendo con la elaboración de un gel en cuadruplicado con todos los resultados positivos de PCR, el cual fue incubado en dos ocasiones en presencia de una solución denaturante de NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M durante 20 min cada una. A continuación se lavó con abundante agua destilada y se neutralizó con una solución de Tris-HCL 1 M pH 8.0 y NaCl 1,5 M en dos ocasiones, con una agitación constante de 20 min cada una. Al finalizar el tratamiento, el gel se invirtió sobre un papel filtro Whatman 3MM saturado previamente con una solución de SSC 2x pH 7.0 (NaCl 3 M, Citrato de Na 0.3 M) que sirve como puente. Sobre el gel invertido se colocó una membrana de nylon Hybond-N+ y papel absorbente. Todo el sistema se presionó con un peso de aproximadamente 1kg durante toda la noche para así transferir el DNA por capilaridad desde el gel a la membrana de nylon. Una vez terminada la transferencia, el DNA se fijó a la membrana irradiando esta última con luz ultravioleta con un equipo UVC500 por un min, para luego dejarla secar (11).

El siguiente paso corresponde a la pre-hibridación de las membranas con una solución de hibridación (5x SSC, reactivo bloqueador del kit 0.5% p/v, lauril sarcosinato de sodio 0.1%, SDS 0.02% p/v), en frascos de hibridación a 55°C por dos horas, distribuyendo la solución en un horno rotatorio. Luego se eliminó al máximo la solución de hibridación y se agregó 5 mL de solución fresca de hibridación, la cual contiene la sonda de kDNA marcada con P<sup>32</sup> previamente desnaturalizada. En este ensayo se utilizaron las sondas que detectan regiones hipervariables para los genotipos TcI, TcII, TcV y TcVI, que fueron

generadas desde los clones de los parásitos sp104, CBB, NR y v195, respectivamente. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche a 55°C y luego se lavaron dos veces por 30 min a 55°C con 50 mL de solución SSC 2x con SDS 0,1% y dos lavados de 15 minutos a 68°C, en una solución de SSC 0.1x con SDS 0,1%. Finalmente, para visualizar las muestras que hibridaron con la sonda marcada, las membranas se colocaron en el Personal Molecular Imager FX (Bio-Rad) según condiciones previamente descritas (11, 29).

Los resultados de las pruebas de PCR y genotipificación de este estudio son analizados por la prueba de Chi-cuadrado (análisis de tabla de contingencia), corrigiendo el nivel de significancia ( $\alpha$ ) por el método de Bonferroni en el caso de la comparación de los genotipos (28).

## RESULTADOS

Se analizaron con la técnica de PCR un total de 319 muestras de deyecciones, detectando 38 y 44 positivas, de 75 y 244 ejemplares de *M. spinolai* y *M. gajardoi* estudiados, respectivamente. El porcentaje de infección por *T. cruzi* obtenido en *M. spinolai*, fue mayor (51%) a lo encontrado en *M. gajardoi* (18%) ( $\chi^2= 31,99$ ,  $P<0.0001$ ; Tabla I). Dentro del grupo costero, al comparar el porcentaje de individuos positivos del sitio 1 (14,1%) con los del sitio 2 (27%), se estableció que en el primero fue menor, resultando en ambos casos las diferencias estadísticamente significativas ( $\chi^2= 4.97$ ,  $P<0.0159$ ; Tabla II). En la caracterización genética de 35 muestras de *M. spinolai*, hubo una mayor frecuencia de los genotipos TcI y TcVI, mientras que en las 25 muestras de *M. gajardoi*, predominó TcV y TcI, no existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $P<0.0125$ ; Tabla III). Conjuntamente fue posible corroborar que los genotipos de *T. cruzi* hallados, en ambos vectores, corresponden a los cuatro tipos de *T. cruzi* estudiados (TcI, TcII, TcV y TcVI). Igualmente, se detectaron algunas infecciones mixtas, principalmente en *M. spinolai*, donde alcanzó un 46%, lo que corresponde a 51 genotipos de un total de 35 muestras genotipificadas. En contraste con esto, para *M. gajardoi*, se observó un 8% de infecciones mixtas, con 27 genotipos de un total de 25 muestras analizadas (Figura 2), siendo estas diferencias significativas ( $\chi^2= 2.66$ ,  $P<0.4471$ ; Tabla IV).

## DISCUSIÓN

Al establecer el número de individuos positivos a *T. cruzi* en los triatominos silvestres provenientes de distintas áreas geográficas, se evidenció diferencias significativas entre

los ejemplares de *M. spinolai* recolectados desde localidades del interior (Reserva Nacional Las Chinchillas), y aquellos *M. gajardo*i pertenecientes a zonas costeras (sitio 1 y sitio 2), obteniéndose un mayor porcentaje de infección en los primeros. Esta situación podría deberse a que al interior de la Región de Coquimbo, existe un clima templado, que alberga una mayor diversidad ecológica y, por consiguiente, un perfil alimentario variado con una amplia gama de posibles hospederos del parásito (12). A su vez, la situación dada en zonas costeras es diametralmente distinta, debido a que se encuentran bajo un régimen climático desértico, con baja cobertura vegetal, constituido básicamente por playas con una mezcla de rocas y arena, donde los vectores costeros suelen coexistir con una mayor cantidad de aves y reptiles teniendo, por lo tanto, una mayor probabilidad de alimentarse de estos. La conocida resistencia natural de las aves a la infección (15,19), más el aún no establecido papel que podrían tener los reptiles como reservorios de la enfermedad, permitiría explicar el menor nivel de infección observado aquí, al contar con una dieta preferentemente compuesta por sangre de estos vertebrados ovíparos (13).

Los resultados entregados a través de los años por diferentes autores sobre la presencia de infección por *T. cruzi* en los vectores silvestres, principalmente en *M. spinolai*, ha sido diversa. Esto podría deberse a los métodos utilizados, donde con el examen microscópico directo se obtuvo en *M. spinolai*, un promedio nacional de infección (desde 1938 hasta 1995) entre la I y la VI región, incluyendo la Región Metropolitana, de 6,9% y 11,4% en 1.007 y 1.229 ejemplares estudiados, respectivamente, con un índice máximo de 25,8% en la IV región (2, 24). A su vez, se registraron un 26,02% de positividad al parásito en 492 insectos recolectados en Colina (con un máximo de infección de 33,9%), convirtiéndose hasta ese entonces en el valor más alto encontrado para este vector (20). Tiempo después, otros investigadores comenzaron a utilizar una herramienta diagnóstica con mayor sensibilidad y especificidad que técnicas anteriores, la PCR. Una vez implementada, se obtuvo un índice nacional de infección de 22,7%, en 154 triatomíneos provenientes del área endémica chagásica en Chile (entre la I y la VI región) con una variación del 0% en la II región, hasta un 41% en la tercera región (8). Asimismo, en Calera de Tango y Til-Til, Región Metropolitana, encontraron un 43% de infección en 225 ejemplares analizados (4), mientras que en la Reserva Nacional las Chinchillas (Región de Coquimbo), se observó 46,1% de positividad a *T. cruzi* en 182 individuos de *M. spinolai* estudiados. Paralelamente, se examinaron mediante microscopía directa a estas mismas 182 vinchucas, registrándose un 10% de infección (5). Años más tarde,

también en la Reserva, se detectó en dos áreas de estudio, un 76,1% y un 40,4% de individuos positivos, en 113 y 114 ejemplares examinados, respectivamente (11).

Este aumento en los porcentajes obtenidos a través del tiempo, coincide con lo visto en nuestro estudio, en donde de los 75 ejemplares capturados, un 51% fue positivo a *T. cruzi*. Si bien no es posible comparar estos resultados con los obtenidos anteriormente, debido a la diferencia existente entre ambas metodologías, si se puede inferir que la observación directa subestima el nivel de infección presente en este triatomino silvestre y, por lo tanto, la real implicancia que podría tener en esta parasitosis.

Con respecto a *M. gajardoi*, su participación en la transmisión de Chagas al ser humano no fue considerada relevante, debido principalmente, a su distribución geográfica que no sólo la ubicaba lejos de los asentamientos humanos, sino que también la limitaba a alimentarse de hospederos con una baja o nula carga parasitaria. Es así como hasta hoy existen escasas investigaciones que determinen su grado de infección. Uno de ellos (D. Frías, comunicación personal), corresponde a especímenes que fueron recolectados desde nidos de aves marinas en Caleta Vitor (Región de Arica y Parinacota) y en cuevas de reptiles en Piedras Negras (en la costa de la II Región). En un total de 25 insectos, 12 y 13 respectivamente, no se encontró evidencia de infección. Si bien esto no hacía más que seguir especulando que este triatomino no estaría infectado, su papel como reservorio de *T. cruzi* aún era incierto, por lo que no era posible descartarlo como vector del Chagas.

Esto cobra sentido cuando en una posterior investigación (6), describieron a poblaciones costeras de *M. gajardoi* provenientes de Playa Corazones (Región de Arica y Parinacota) y Medano (Región de Antofagasta) como positivas a *T. cruzi*. Aunque el porcentaje de infección encontrado con la PCR fue solo un 11,8% en 17 ejemplares estudiados, permitió dar a conocer la existencia de un ciclo costero silvestre de la enfermedad. Nuestros resultados condicen con lo expuesto anteriormente, ya que también fue posible establecer a este triatomino como potencial vector de la infección chagásica, con un 18% de positividad de un total de 244 individuos estudiados. Sin embargo, es importante aclarar que existen diferencias significativas en los porcentajes de infección encontrados según el lugar desde donde fueron recolectados los vectores. Es así como en aquellos provenientes de sectores costeros silvestres (sitio 1), se observó un menor número de insectos infectados con *T. cruzi* (14,1%), que en los provenientes de sectores costeros periurbanos (sitio 2) con un 27,0%. Esto podría relacionarse con la riqueza y diversidad

de fuentes de alimento existente en ambos sitios, siendo más amplia y abundante en el segundo, debido a la cercanía que aquí existiría con viviendas humanas asociadas con la actividad pesquera, sumada a la presencia de animales domésticos, como perros y gatos. A su vez, en el primero, la marcada presencia de aves y reptiles, unido a la escasez de otras formas de alimentación, como mamíferos reservorios del parásito, sería la más probable explicación.

Con respecto a los genotipos de *T. cruzi* encontrados en las localidades del interior y costeras, se observó una mayor prevalencia del genotipo TcI, seguido muy de cerca por TcVI y TcV, no siendo dichas diferencias significativas. Esto es una evidencia más, que sugiere que no existe una estructuración en la distribución de genotipos, estando *T. cruzi* en ambas zonas geográficas, pudiendo a su vez, existir un flujo entre ambos ciclos silvestres. Asimismo, fue posible establecer la presencia de infecciones mixtas, principalmente en *M. spinolai*, detectándose en éste un leve predominio de TcI y TcV. La existencia fundamentalmente de una mayor variedad de hospederos de los cuales alimentarse, sería la explicación más plausible, ya que aumentaría la probabilidad de albergar diferentes genotipos, a diferencia de aquellos casos en donde la dieta se basa casi exclusivamente del mismo tipo de reservorio, o incluso de vertebrados no infectados. Sin duda, las continuas migraciones del ser humano hacia zonas costeras silvestres y, por lo tanto, la consiguiente llegada de nuevas fuentes de alimentación, sumado a que de acuerdo a nuestros resultados *M. gajardoi* estaría naturalmente infectado por *T. cruzi*, lo convertirían en un potencial riesgo para la población humana coexistente.

Es importante ahora hacer alusión a *T. infestans*, ya que permite tener una visión más amplia de la situación de la enfermedad de Chagas en nuestro país. Si bien estaría bastante controlada su presencia en viviendas, en el 2006 se reportó el primer hallazgo de este triatomino asociados a matorrales, en Calera de Tango, Región Metropolitana. El porcentaje de infección encontrado en 44 ejemplares a través de la PCR, fue de un 41% (4). Posteriormente, utilizando la misma técnica, en el 2010, en las comunas de Talagante y Calera de Tango, Región Metropolitana, asociados a sectores silvestres, se recolectaron 38 y 23 insectos, encontrando un nivel de infección de 50% y 47,8%, respectivamente. Asimismo en la Región de Valparaíso, comuna de Putaendo, se capturaron 52 ejemplares, encontrando un 36,5% de infección con *T. cruzi*. Con respecto a los genotipos circulantes, TcI fue el más presente, con 87% en la Región Metropolitana y 63% en la Región de Valparaíso. Para TcII, se encontró un 30% en la Región Metropolitana y un

84% en la Región de Valparaíso (25). Esto último es importante de destacar, ya que TcII es un genotipo asociado al ciclo doméstico de transmisión del Chagas, por lo que encontrarlo en sectores silvestres podría estar obedeciendo a un fenómeno de replegamiento de *T. infestans* desde los domicilios, pudiendo a futuro, recolonizar su antiguo nicho (4,25). A su vez, TcI se asocia al ciclo silvestre, y su presencia en este vector de hábitos domiciliarios podría cambiar la dinámica de la infección chagásica en nuestro país (25).

## CONCLUSIONES

- El mayor número de ejemplares de *M. spinolai* infectados con *T. cruzi* podría estar relacionado al sector donde habitan, ya que tendrían acceso a una mayor diversidad de vertebrados, los cuales pueden actuar como eventuales reservorios del parásito.
- *M. gajardoi*, al estar naturalmente infectado, formaría parte del establecimiento del ciclo costero silvestre de la enfermedad, por lo que sería importante seguir estudiando su papel en la transmisión de esta zoonosis.

Los genotipos de *T. cruzi* observados corresponden a los cuatro tipos de *T. cruzi* estudiados (TcI, TcII, TcV y TcVI), existiendo además algunas infecciones mixtas, principalmente en *M. spinolai*, debido a la amplia gama de posibles hospederos de distintos linajes del parásito, de los cuales podría alimentarse.

Como conclusión final, la conexión sugerida entre ambos ciclos silvestres, se basaría en que no se observa una estructuración en la distribución de los genotipos, por lo que todos los genotipos de *T. cruzi* estaría en ambas zonas geográficas, tanto costeras como del interior.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto FONDECYT 1085154 (AS), y muestras de *M. spinolai* de la Reserva Nacional Las Chinchillas fueron facilitadas por el Proyecto FONDECYT 11090086.

## REFERENCIAS

1. **APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; NOEMÍ, I.; SAN MARTÍN, A.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I.** 2008. Enfermedad de Chagas. En: Rev. Chil. Infect. 25:190-193.
2. **APT, W.; REYES, H.** 1990. Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. Parasitol. al Día. 14:23-40.
3. **ATÍAS, A.** 1998. Enfermedad de Chagas. Triatomas, Chinchas y Cucarachas. En: Parasitología Médica. Primera edición. Editorial Mediterráneo. Santiago, Chile. 251-264.
4. **BACIGALUPO, A.; SEGURA, J.; GARCÍA, A.; HIDALGO, J.; GALUPPO, S.; CATTAN, P. E.** 2006. First finding of Chagas disease vectors associated with wild bushes in the Metropolitan Region of Chile. Rev. Méd. Chile. 134:1230-1236.
5. **BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ROZAS, M.; CATTAN, P.; SOLARI, A.** 2005. DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in the Chilean wild vector *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100:237-239.
6. **BOTTO-MAHAN, C.; SEPÚLVEDA, M.; VIDAL, M.; ACUÑA, M.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.** 2008. *Trypanosoma cruzi* infection in the sylvatic kissing bug *Mepraia gajardo* from the Chilean Southern Pacific Ocean coast. Acta Trop. 105:166-169.
7. **BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M.** 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2º Edição. Guanabara Koogan Ed. Rio de Janeiro, Brasil. 431 pp.
8. **BUSTAMANTE, A.** 2003. Memoria. Detección de infección por *Trypanosoma cruzi* en *Mepraia spinolai* mediante la técnica de reacción de la polimerasa en cadena; obtención del índice trypano/triatomino. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.

9. **CALLEROS, L.; PANZERA, F.; BARGUES, M.D.; MONTEIRO, F.A.; KLISIOWICZ, D.R.; ZURIAGA, M.A.; MAS-COMA, S.; PÉREZ, R.** 2010. Systematics of *Mepraia* (Hemiptera-Reduviidae): cytogenetic and molecular variation. *Infect. Genet. Evol.* 10:221-228.
10. **CAMPOS, R.; ACUÑA, M.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTÍZ, S.; CATTAN, P.E; SOLARI, A.** 2007b. Susceptibility of *Mepraia spinolai* and *Triatoma infestans* to different *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected rodent hosts. *Acta Trop.* 104:25-29.
11. **CORONADO, X.; ROZAS M.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTÍZ, S.; CATTAN P.E; SOLARI, A.** 2009. Molecular epidemiology of Chagas disease in the wild transmisión cycle: The evaluation in the selvatic vector *Mepraia spinolai* from an endemic area of Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 81: 656-659.
12. **FRÍAS, D.; HENRY, A.; GONZÁLEZ, C.** 1998. *Mepraia gajardoi* una nueva especie de triatominae (Hemiptera: Reduviidae) para Chile y su comparación con *Mepraia spinolai* (Porter, 1934). *Rev. Chi. His. Nat.* 71:177-188.
13. **FRÍAS, D.; SOLARI, A.; GONZÁLEZ, C.; HENRY, A.; ALVIÑA, A.** 1995. Índices de infección de *Mepraia spinolai* con *Trypanosoma cruzi*, su invasión a ambientes domésticos e interacción con *Triatoma infestans*. *Parasitol. al Día.* 19:195.
14. **FRÍAS, D.** 2010. A New Species and Karyotype Variation in the Bordering Distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardoi* Frías et al (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its Parapatric Model of Speciation. *Neotrop. Entomol.* 39(4):572-583.
15. **KIERSZENBAUM, F.; IVANYI, J.; BUDZCO, D.** 1976. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *T. cruzi* infection. *Immunology.* 30:1-6.
16. **LENT, H.; WYGODZINSKY, P.** 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163:1-512.
17. **LORCA, M.; GARCÍA, A.; CONTRERAS, M.; SCHENONE, H.; ROJAS, A.** 2001. Evaluation of a *Triatoma infestans* elimination program by the decrease of *Trypanosoma*

*cruzi* infection frequency in children younger than 10 years, Chile, 1991-1998. Am. J. Trop. Med. Hyg. 65:861-864.

18. **MACHADO, C.; AYALA, F.** 2002. Sequence variation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 121:33-47.

19. **NERY-GUIMARAES, F.; LAGE, H.** 1972. A refratariedade das aves ao *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* II. Refratariedade das galinhas desde o nascimento, persistencia da refratariedade após bursectomia I infeccoes em ovos embrionados. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 70:97-10.

20. **ORDENES, H.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.E.; CANALS, M.** 1996. Infección Tripano-triatomino de *Triatoma spinolai* en una zona de riesgo epidemiológico. Rev. Med. Chile. 124:1053-1057.

21. **ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD.** 2002. El control de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América. Historia de una iniciativa internacional 1991/2001. Uberaba: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 316 pp.

22. **PÉREZ, A.; PÉREZ, J.; NAVARRO, M.; LÓPEZ, R.** 2009. Enfermedad de Chagas en personas procedentes de Latinoamérica residentes en España. Unidad de Medicina Tropical del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Ramón y Cajal. Madrid, España.1-85.

23. **SCHENONE, H.; VILLARROEL, F.; ROJAS, A.** 1995. Presencia de *Triatoma spinolai* en viviendas humanas. Bol. Chil. Parasitol. 50:76-79.

24. **SCHENONE, H.; VILLARROEL F.; ROJAS A.; ALFARO E.** 1980. Factores biológicos y ecológicos en la epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile. Bol. Chi. Parasitol 35: 42-54.

25. **SEGOVIA, V.** 2010. Memoria. Genotipos clonales de *Trypanosoma cruzi* presentes en ejemplares de *Triatoma infestans* provenientes de áreas silvestres y domiciliarias de la Región Metropolitana y V región. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.

26. **SCHOFIELD, C. J.** 1994. Triatominae: Biología y Control. Eurocommunica Publications. Ed. West Sussex. U.K. 76-80.
27. **SIMPSON, L.** 1987. The mitochondrial genome of kinetoplast protozoa: genomic organization, transcription; replication and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:363-382.
28. **SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J.** 1995. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. WH Freeman & Company. U.S.A. 887 pp.
29. **SOLARI, A.; CAMPILLAY, R.; ORTIZ, S.; WALLACE, A.** 2001. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Exp. Parasitol.* 97:226-233.
30. **STURN, N.; CAMPBELL, D.** 2010. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 115:35-43.
31. **TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F.** 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:115-119.
32. **WESTENBERGER, S.; BARNABE, C.; CAMPBELL, D., STURM, N.** 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics.* 171:527-543.
33. **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.; STURM, 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.* 104:1051-1054.

**Tabla I: Porcentajes de infección por *Trypanosoma cruzi* en los vectores silvestres *Mepraia* sp. y sus respectivos sitios de muestreo.**

Nombre localidad	Latitud y longitud	Nº IP/TC
Playa Corazones, ZCS	18°28'47" S; 70°19'27" O	6/37 (16,2%)
Caleta Vitor, ZCS	18°45'45" S; 70°20'34" O	13/58 (22,4%)
Caleta Camarones, ZCS	19°12'16" S; 70°16'08" O	5/75 (7,0%)
Río Seco, ZCP	21°00'06" S; 70°09'52" O	12/46 (26,1%)
San Marcos, ZCP	21°06'56" S; 70°07'30" O	8/28 (29,0%)
Reserva Nacional Las Chinchillas, ZI	31°30'28" S; 71°06'19" O	38/75 (41,0%)
<b>TOTAL</b>		<b>82/319 (26,0%)</b>

Nº P/C: Número de insectos positivos/total de capturados. ZCS: Zona Costera Silvestre. ZCP: Zona Costera Periurbana. ZI: Zona del Interior.

**Tabla II. Número de individuos *M. gajardoi* positivos a *T. cruzi* y porcentaje de infección, según sitio de recolección.**

Zona de estudio	Ubicación	NºIP/TI	PI
Sitio 1 (ZCS)	18°28'47" S; 70°16'08" O	24/170	27,0%
Sitio 2 (ZCP)	21°00'06 ; 70°07'30" O	20/74	14,1%
Total <i>M. gajardoi</i>		44/244	18,0%

NºIP/TI: Número de individuos positivos/Total de individuos. PI: Porcentaje de Infección. ZCS: Zona costera silvestres. ZCP: Zona costera periurbana.

**Tabla III. Número y porcentaje de genotipos de *T. cruzi* encontrados en ambos triatomos.**

Genotipo	Número y porcentaje de genotipos	
	<i>M. spinolai</i>	<i>M. gajardoi</i>
TcI	16 (31%)	8 (30%)
TcII	11 (22%)	4 (15%)
TcV	9 (18%)	9 (33%)
TcVI	15 (29%)	6 (22%)

TcI, TcII, TcV, TcVI: *Trypanosoma cruzi* I, II, V y VI, respectivamente. Nota: la suma sobre 100% representa los casos de infecciones mixtas.

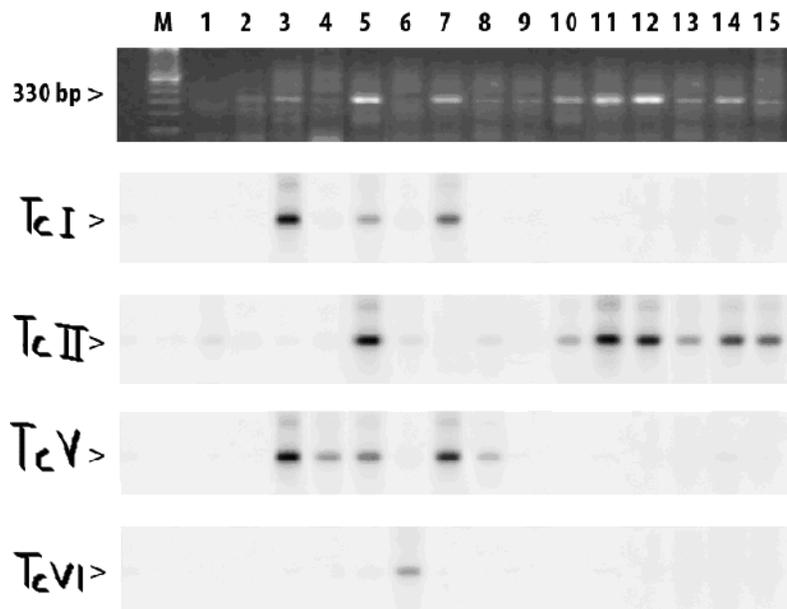
**Tabla IV. Número y porcentaje de infecciones mixtas en ejemplares *Mepraia* sp.**

<i>Mepraia</i> sp.	N°IM/TMG	PIM
<i>M. spinolai</i>	16/35	46%
<i>M. gajardoi</i>	2/25	8%

N°IM/TMG: Número de infecciones mixtas/Total muestras genotipificadas. PIM: Porcentaje de infecciones mixtas.



**Figura 1a.** Mapa de las localidades del norte de Chile estudiadas. **Figura 1b.** Zona costera silvestre, sitio 1 (foto: cortesía de Dr. Campos). **Figura 1c.** Zona costera periurbana, sitio 2 (foto: cortesía de Dr. Campos).



**Figura 2.** Determinación de genotipos de *T. cruzi* circulantes en triatomíneos *Mepraia* sp.