



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi* EN *Oryctolagus cuniculus* y *Octodon degus* MEDIANTE PCR Y XENODIAGNÓSTICO UTILIZANDO DOS ESPECIES DE VECTORES

RICARDO ANDRES CAMPOS SOTO

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

PROFESOR GUIA: ALDO SOLARI

Financiado por proyecto Fondecyt N° 1040762 y proyecto Fondecyt N° 1040711

**SANTIAGO, CHILE
2007**



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi* EN *Oryctolagus cuniculus* y *Octodon degus* MEDIANTE PCR Y XENODIAGNOSTICO UTILIZANDO DOS ESPECIES DE VECTORES

RICARDO ANDRES CAMPOS SOTO

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA : ALDO SOLARI
PROFESOR CONSEJERO: PEDRO E. CATTAN
PROFESOR CONSEJERO: FERNANDO FREDES

**SANTIAGO, CHILE
2007**

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	2
1.- <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
2.- Ciclo biológico.....	3
3.- DNA kinetoplastídico	3
4.- Enfermedad de Chagas	4
5.- Vector	5
6.- Aspectos clínicos	5
7.- Diagnóstico	6
8.- Reacción de la polimerasa en cadena	7
a).-Denaturación.....	7
b).-Alineación.....	7
c).-Elongación.....	7
9.- Hospederos silvestres y sinantrópicos	8
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
MATERIAL Y METODO	11
1.- Roedores e insectos	11
2.- Obtención de sangre y procesamiento	11
3.- Técnica de PCR	12
4.- Xenodiagnóstico	13
5.- Transferencia del DNA a membranas por simple difusión	14
6.- Preparación de la sonda	15

7.- Marcación radioactiva de la sonda	15
8.- Hibridación con la sonda radiactiva	16
RESULTADOS	17
1.- Detección de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
- Tabla 1: Resultados de los xenodiagnósticos realizados en <i>Octodon degus</i> con <i>Triatoma infestans</i> y <i>Mepraia spinolai</i> , PCR del contenido intestinal del vector y sangre del roedor.....	17
- Tabla 2: Resultado de los pesos de ambas especies de vinchucas antes y después de ser alimentadas en <i>Octodon degus</i> y N° de vinchucas ocupadas.....	18
- Tabla 3: <i>Octodon degus</i> infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> a través de PCR en muestras de sangre y contenido intestinal de ambas especies de vinchuca alimentadas con los roedores.....	19
2.- Genotipificación de <i>Trypanosoma. cruzi</i>	19
- Tabla 4 : Resultados de la hibridación del kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> con las diferentes sondas de los genotipos Tc I, Tc IIb, Tc IIC y TcIIe.....	19
- Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de las muestras positivas y Southern blott con las distintas sondas de los genotipos Tc I, Tc IIb, Tc IIc y Tc IIe.....	20
DISCUSION	21
CONCLUSIONES	24
REFERENCIAS	25

ABSTRACT

In this assay study we report the *Trypanosoma cruzi*-detection in the wild rodent *Octodon degus* by means of blood and xenodiagnosis PCR using the domestic and wild vectors of Chagas disease, *Triatoma infestans* and *Mepraia spinolai*, respectively. We studied 35 *Octodon degus* and 33 *Oryctolagus cuniculus* collected in a endemic zone, from Chile. Blood samples and intestinal contents of vectors fed with the animals were used to perform PCR. The results indicate that the percentage of rodents naturally infected with *Trypanosoma cruzi* depends on the biological sample used for PCR and the vector species for the xenodiagnosis. PCR performed on blood samples did not detect *Trypanosoma cruzi*-DNA, but PCR from intestinal contents indicated that both vectors were positive to the protozoan and, therefore, more sensitive detecting *Trypanosoma cruzi* in these species. *Mepraia spinolai* resulted four times more sensitive to detect *Trypanosoma cruzi*-infected *Octodon degus* than *Triatoma infestans*, 22.9% and 5.7%, respectively.

The results with *Oryctolagus cuniculus* were negative either with blood or insect samples. All positives PCR samples were analysed by hybridization test using four different *Trypanosoma cruzi* genotype specific probes. The results of hybridization indicate that *Mepraia spinolai* detected more *Trypanosoma cruzi* genotypes than *Triatoma infestans*. These result suggest that *Mepraia spinolai* is an insect with better vectorial capacity than *Triatoma infestans*. Finally we report the improvement of *Trypanosoma cruzi* detection in sylvatic animals by a combination of PCR and xenodiagnosis using the endogenous and sylvatic vector *Mepraia spinolai*.

RESUMEN

En este estudio demostramos la detección de *Trypanosoma cruzi* en el roedor silvestre *Octodon degus* por medio de PCR en sangre y xenodiagnóstico usando los vectores doméstico (*Triatoma infestans*) y silvestre (*Mepraia spinolai*) de la enfermedad de Chagas. Se estudiaron 35 *Octodon degus* y 33 *Oryctolagus cuniculus* capturados en un área endémica de Chile. Para realizar el PCR se usaron muestras de sangre y contenido intestinal de los vectores alimentados con los animales.

Los resultados muestran que el porcentaje de roedores naturalmente infectados con *Trypanosoma cruzi* depende de la muestra biológica usada en el PCR y la especie de vector usada en el xenodiagnóstico. Los PCR realizados en muestras de sangre no detectaron el DNA de *Trypanosoma cruzi*, pero el PCR del contenido intestinal indicó que ambos vectores fueron positivos al protozoo. Por lo tanto esta prueba resultó más sensible para detectar el *Trypanosoma cruzi* en estas especies. Por su parte *Mepraia spinolai* resultó 4 veces más sensible en detectar la infección por *Trypanosoma cruzi* en *Octodon degus* que *Triatoma infestans*, 22.9% y 5.7% respectivamente. Los resultados en *Oryctolagus cuniculus* fueron negativos tanto en las muestras de sangre como en los insectos. Todas las muestras positivas al PCR fueron analizadas con pruebas específicas de hibridación usando cuatro genotipos diferentes de *Trypanosoma cruzi*. Los resultados de la hibridación indican que *Mepraia spinolai* detectó más genotipos de *Trypanosoma cruzi* que *Triatoma infestans*. Estos resultados plantean que *Mepraia spinolai* es un insecto con una mejor capacidad vectorial que *Triatoma infestans*. Finalmente se informa el mejoramiento de la detección de *Trypanosoma cruzi* en animales silvestres con una combinación de PCR y xenodiagnóstico usando el vector endógeno y silvestre *Mepraia spinolai*.

AGRADECIMIENTOS

- . Dr. Aldo Solari
- . Dr. Pedro Cattán
- . Dra. Silvia Ortiz
- . Dra. Carezza Botto-Mahan
- . Dra. Mariana Acuña
- . Dr. Fernando Fredes
- . Carla Cornejo

Muchas gracias a todos por su colaboración que fue muy importante en la realización de este trabajo.

Dedicado a mis padres Ana y Hugo

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas, es considerada una de las principales zoonosis de amplia distribución mundial, ocasionando graves trastornos económicos y de salud pública. El agente etiológico de esta enfermedad es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, capaz de infectar al hombre, mamíferos domésticos, sinantrópicos y silvestres. Estos últimos por su condición de reservorios naturales de *T. cruzi* son el grupo de mayor relevancia epidemiológica. Esta enfermedad es adquirida principalmente a través del insecto vector, pudiendo ser transmitida también por vía transfusional, transplacentaria, transplante de órganos, oral y lactogénica.

Hay pocos estudios de la tripanosomiasis en el ciclo silvestre; a esto se suma que la mayoría de los estudios para detectar el parásito en mamíferos se han realizado por métodos convencionales, que se traduce en un alto porcentaje de resultados falsos negativos. En el presente estudio se evaluó la infección por *T. cruzi* en el conejo europeo, *Oryctolagus cuniculus* y en el roedor degú, *Octodon degus* capturados de áreas endémicas de la IV región del país, utilizando como método diagnóstico la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Este es un método sensible, que consiste en la detección y amplificación de una región variable de los minicírculos del DNA kinetoplastídico de *T. cruzi*. También se compararon estos resultados con el xenodiagnóstico realizado en estos mismos animales con las dos especies de triatomíneos endémicas de Chile, es decir *Triatoma infestans* y *Mepraia spinolai*. Finalmente a través de la técnica de hibridación con sonda se genotipificaron las muestras positivas.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

1.- *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado del orden Kinetoplastida, que posee una gran mitocondria (kinetoplasto) que contiene DNA, este DNA está organizado en una red encadenada de maxicírculos y minicírculos (De Souza, 2000). Este parásito presenta distintos estados morfológicos según el hospedero en que se encuentre, describiéndose las siguientes formas : 1.- Tripomastigote: de aspecto fusiforme, alargado y un flagelo en el extremo anterior; se encuentra en la sangre de mamíferos y en el intestino posterior de triatomíneos; es la forma infectante para mamíferos y triatomíneos, pero no se multiplica; 2.- Epimastigote: de aspecto ovalado con un flagelo en el extremo anterior; se encuentra en el intestino medio de los triatomíneos donde se multiplica; 3.- Amastigote: forma ovalada con un flagelo no emergente; y es la forma proliferativa del parásito en las células de los hospederos vertebrados (Atias, 1998).

Con estudios isoenzimáticos se pudo demostrar que existe una gran diversidad genética de *T. cruzi*, agrupándose en tres grupos isoenzimáticos que fueron llamados zimodemos Z1, Z2, y Z3. Estudios epidemiológicos demostraron que Z1 y Z3 están principalmente asociados al ciclo silvestre, en tanto que Z2 con el ciclo doméstico (Miles *et al.*, 1978). Estudios filogenéticos de *T. cruzi* demostraron que este puede ser dividido en dos linajes divergentes llamados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II, a su vez el segundo linaje puede ser dividido en cinco subdivisiones TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcII d y TcIIe, Z1 corresponde a TcI, mientras que Z2 y Z3 corresponden a los sublinajes TcIIb y TcIIa, respectivamente.

Los sublinajes TcIIa, TcIIc, TcIIId y TcIIe se consideran híbridos (Brisse *et al.*, 2000a; 2000b; 2001; Westernberger *et al.*, 2005).

2.- Ciclo biológico

Los triatomíneos se infectan al ingerir sangre de mamíferos infectados con tripomastigotes, los cuales pasan al lumen del intestino medio donde se multiplican como epimastigotes por fisión binaria. Después de 15 a 30 días los epimastigotes migran a la pared del intestino posterior, para transformarse en tripomastigotes metacíclicos. Posteriormente, el triatomíneo al picar emite heces con tripomastigotes que al atravesar la piel por el sitio de picadura o vía mucosa infectan al mamífero. Una vez en la sangre de éste los tripomastigotes penetran en células de diferentes tejidos y se multiplican como amastigotes por fisión binaria hasta destruir la célula liberando los parásitos a circulación y penetrando en otras células. El ciclo se completa cuando triatomíneos no infectados ingieren sangre de mamíferos infectados con tripomastigotes (Schofield, 1994; Atias, 1998; De Souza, 2000).

3.- DNA kinetoplastídico

El DNA mitocondrial del *T. cruzi* representa cerca del 20% del DNA total. Está formado por minicírculos (1.4 kb) y maxicírculos (16.0 kb) de DNA encadenados formando una compleja red compacta (Riou y Pautrizel, 1969). Existen al menos 50 copias idénticas de maxicírculos que son similares al DNA mitocondrial de los eucariontes superiores y codifican RNAs ribosomales y proteínas involucradas en la generación de ATP en la mitocondria (Simpson, 1987). Los minicírculos en cambio existen en un número variable entre 3.000 y 30.000 copias, pudiendo haber heterogeneidad de secuencia entre los minicírculos de cada clon de *T. cruzi*. La función de estos minicírculos es la de codificar

transcritos llamados RNA guías, los cuales dirigen la modificación postranscripcional de los mRNA mitocondriales, fenómeno llamado “editing” (Sturn y Simpson, 1990).

Cada minicírculo presenta cuatro regiones de secuencia altamente conservada, las cuales están regularmente distribuidas cada 90° entre sí y con un tamaño cercano a las 120 pb y representan los orígenes de la replicación de los minicírculos (Kitchin *et al.*, 1985). También cada minicírculo contiene cuatro regiones hipervariables con una secuencia de tamaño cercano a 250 pb, codificantes para los RNA guías las cuales están entre las regiones conservadas. En todos los minicírculos secuenciados de las distintas especies de tripanosomátideos, se ha observado en la región conservada la existencia de tres bloques denominados bloques de secuencia conservada: BSC-1 (5' -AGGGGCGTTC-3'), BSC-2 (5' -CCCCGTAC-3') y BSC-3 (5'-GGGGTTGGTGTA-3'); los cuales son uniformes en sus secuencias, ordenamiento y distancia entre ellos (Ray, 1989; Sheline y Ray, 1989).

4.- Enfermedad de Chagas

La infección chagásica ha sido detectada en áreas rurales y suburbanas de Chile, entre los 18° 30' y 34° 16' latitud sur correspondiente a zonas áridas y semiáridas. Actualmente existen en Chile aproximadamente 142.000 personas infectadas y 1.000.000 están en riesgo de infección (OPS/OMS, 2003). La principal vía de transmisión al hospedero, en los diferentes países americanos, es causada por más de cien especies de triatomos hematófagos, que circulan por los ciclos domésticos, peridomésticos y silvestres. (Schofield, 1994). En nuestro país existen tres especies de triatomos: *T. infestans*, Klug 1834; *M. spinolai*, Porter 1934 y la recientemente descrita *Mepraia gajardoi* (Frías *et al.*, 1998). *T. infestans* corresponde a la especie doméstica mientras que

M. spinolai y *M. gajardoi* corresponden a especies silvestres endémicas de Chile (Canals *et al.*, 2000).

5.- Vector

Los triatomíneos tienen un ciclo vital hemimetabólico típico, pasando desde el huevo, por cinco estados ninfales hasta llegar a los machos y hembras adultas. Aparentemente el termotropismo es el mayor estímulo para alimentarse. Son hematófagos estrictos y la mayoría de las especies tardan entre 10 y 20 minutos en alimentarse hasta la repleción. Los movimientos del hospedero les molestan por lo que es común que cada ninfa tome varias comidas pequeñas entre cada muda, aunque a veces una sola comida hasta la repleción basta para producir la muda. Los adultos pueden tomar sangre entre 2 a 4 veces su peso, mientras que las ninfas pueden alcanzar entre 8 a 9 veces su peso (Schofield, 1994; Atias, 1998). Los datos epidemiológicos respecto del porcentaje de seres humanos infectados por vía vectorial, estiman que entre un 0,65% y 5,8% del total de los casos del país, son debido a *M. spinolai*. El promedio de infección por *T. cruzi* en este vector alcanza el 11,4%, llegando al 25,8% en la IV región (Ordenes *et al.*, 1996; Canals *et al.*, 1998). Sin embargo, usando herramientas diagnósticas más sensibles como PCR, se alcanzan cifras de hasta 46% (Botto-Mahan *et al.*, 2005).

6.- Aspectos clínicos

En la enfermedad de Chagas sólo el 20 al 25 % de los casos humanos presenta sintomatología (Apt y Reyes, 1990). En la fase aguda de la enfermedad hay proliferación del parásito en distintas células, caracterizándose también por una alta parasitemia y

aumento del volumen de los nódulos linfáticos, esplenomegalia, hepatomegalia, meningoencefalitis y cardiomegalia por la dilatación de las cavidades del corazón.

En la fase crónica, el compromiso orgánico se centra principalmente en miocardio y tubo digestivo. En estos casos se pueden desarrollar enormes cardiomegalias por la dilatación e hipertrofia del miocardio. En el tubo digestivo, principalmente el esófago y el colon aparecen elongados y muy dilatados, con importante hipertrofia de la capa muscular. En esta fase el parasitismo decae por la respuesta inmune del hospedero disminuyendo la parasitemia lo que dificulta su diagnóstico directo (Atias y Apt, 1991).

7.- Diagnóstico

Las pruebas de diagnóstico más utilizadas han sido las pruebas serológicas, pero tienen una baja especificidad debido a problemas de reacciones cruzadas con *Mycobacterium leprae*, *Leishmania sp* y *Trypanosoma rangeli* (Shumuñis, 1991). El xenodiagnóstico que tiene una especificidad del 100% presenta una baja sensibilidad, su rendimiento es de sólo entre 17 y 70% del obtenido por métodos serológicos (Schenone *et al.*, 1974).

La técnica de PCR utilizada para amplificar segmentos del DNA kinetoplastídico de *T. cruzi* a partir de muestras de sangre y contenido intestinal de vinchuca, en animales y humanos, ha demostrado ser sensible y exitosa lo que permite mejorar el diagnóstico de la enfermedad en infecciones crónicas (Zulantay *et al.*, 2004; Botto-Mahan *et al.*, 2005; Rozas *et al.*, 2005).

8.- Reacción de la polimerasa en cadena

La técnica de PCR es un método para amplificar ácidos nucleicos, esto se logra con la repetición de un set de tres pasos sucesivos (denaturación, alineación y elongación) bajo condiciones controladas de temperatura que van siendo modificadas por el termociclador, al conjunto de estas tres etapas se las denomina ciclos (Oste, 1988).

a).- Denaturación: La doble hebra de DNA usada como molde es denaturada por incubación a alta temperatura. Las dos hebras ahora disociadas permanecerán libres hasta que la temperatura baje lo suficiente para permitir la alineación o hibridación de los oligonucléotidos usados como partidores.

b).- Alineación: oligonucléotidos sintéticos o primers se unen o alinean a sitios vecinos a la región a ser amplificada. La secuencia de los primers es determinada por la secuencia del DNA, en los límites de la región a ser amplificada, cuando los primers se alinean lo hacen enfrentando sus extremos 3`.

C).- Elongación: en este proceso los oligonucléotidos de la mezcla son incorporados al producto de extensión por la DNA polimerasa termoestable. El producto amplificado de interés comienza a acumularse luego de tres ciclos y como los ciclos siguen aumentando, los amplificados empiezan a actuar como molde aumentando estos en forma exponencial en cada ciclo (Oste, 1988).

9.- Hospederos silvestres y sinantrópicos

En Chile, estudios serológicos de la enfermedad de Chagas realizados en animales sinantrópicos del valle de Limarí, IV región, entregaron índices de infección de un 19,8% en caninos, 13,4% en bovinos, 15,8% en equinos y un 17,8% en asnales (Rios *et al.*, 1986). Posteriormente, estudios realizados en Illapel han establecido índices de infección de 5,9% en caprinos y 6,9% en caninos (Ulloa *et al.*, 1989). Así también en San Pedro de Atacama en un estudio de 65 perros (analizados por Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta) un 4,6% fue positivo (Burchard *et al.*, 1996). Sin embargo un rol más importante podría estar desempeñando el conejo *O. cuniculus*, por su influencia en el ciclo silvestre y por ser uno de los hospederos preferidos de *M. spinolai* (Acuña, 2001).

Los primeros hallazgos de *T. cruzi* en el ciclo silvestre se establecieron por xenodiagnóstico en *O. degus*, *Canis culpaeus* y *Canis griseus* (Whiting, 1946). Otro estudio realizado en la localidad de Aucó (IV región), a través de la reacción de hemoaglutinación indirecta (RHAI), reveló un 13,5% de positividad en los animales estudiados. Se determinó también un 31,6% de positividad en *Chinchilla lanigera* mediante RHAI, mientras tanto que 36,4% de *Abrocoma bennetti* fue positivo a RHAI y 11,1% al xenodiagnóstico; el 10% de *Phyllotis darwini* fue positivo al xenodiagnóstico y un 8,3% de ejemplares *O. degus* fueron positivos por RHAI y 12,9% al xenodiagnóstico. Se concluyó que la endemoenzootia chagásica es un importante factor que afecta a estas comunidades y *T. cruzi* permanece circulando entre estos micromamíferos vectorizado por *M. spinolai* (Durán *et al.*, 1989). El más reciente estudio realizado en la misma zona a través de la PCR reveló que de un total de 157 mamíferos silvestres el 43% fue positivo incluyendo un 46% para *Thylamys elegans*, un 45% para *Abrothrix olivaceus*, un 42%

para *O. degus* y un 42% para *P. darwini*. También se encontró un 26% de positividad en cabras (*Capra hircus*). Estos resultados demostraron una mayor infección que los estudios previos realizados mediante métodos convencionales en la misma zona de estudio (Rozas *et al.*, 2005).

Datos de Acuña (2001) han demostrado que colonias de *M. spinolai*, alimentadas en conejos, mejoran parámetros poblacionales al compararlas con colonias alimentadas en roedores. Por ello, el conejo europeo aparece como un eventual nuevo hospedero para el *T. cruzi*, lo que fue investigado en el presente trabajo.

HIPÓTESIS

H.1.- La detección de *T. cruzi* mediante PCR y xenodiagnóstico realizados en *O. degus* es mayor que la detectada en *O. cuniculus*, dado su mayor tiempo de coevolución.

H.2.- Los resultados del xenodiagnóstico realizados con *T. infestans* son distintos a los resultados realizados con *M. spinolai*. Dada su adaptación a diferentes hospederos

OBJETIVO GENERAL

Detectar la prevalencia de infección por *T. cruzi* en dos mamíferos silvestres *O. cuniculus* y *O. degus*, contribuyendo a ampliar el conocimiento sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas en el ciclo silvestre.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Detección del kDNA de *T. cruzi* mediante PCR en *O. cuniculus* y *O. degus* para determinar la prevalencia de infección en estas especies en una zona endémica de la IV región.
- 2.- Comparar los resultados del xenodiagnóstico realizado con *T. infestans* y *M. spinolai*.
- 3.- Genotipificación del producto amplificado en las muestras positivas con ensayos de hibridación usando distintas sondas de DNA marcado.

MATERIAL Y METODOS

1.- Roedores e insectos

Se trabajó con un número muestral de 33 *O. cuniculus* y 35 *O. degus* capturados en un área endémica de la IV región en la Reserva Nacional las Chinchillas (31° 30' 03" S; 71° 06' 20" W), esta zona cuenta con un clima semiárido y con precipitaciones esporádicas en los meses de invierno. Los animales fueron capturados con trampas del tipo Sherman en periodos nocturnos y diurnos. También se utilizó un grupo de 1.200 triatominos en estadios ninfales I, II y III de ambas especies, que estaban libres del parásitos pues se han criado en los vinchuqueros de las Facultades de Medicina y Ciencias de la Universidad de Chile y fueron alimentadas con ejemplares de *Gallus gallus*.

2.- Obtención de sangre y procesamiento

La sangre se obtuvo mediante punción cardiaca, previa sedación del animal con un anestésico inhalatorio. Para llevar a cabo la PCR se realizó la extracción del DNA de la muestra de sangre el que fue extraído mediante el Kit E.Z.N.A. Blood DNA®. Para esto se ocupó una cantidad de 250µl de sangre por cada animal luego de cumplir con los pasos señalados en el kit; la muestra de DNA se precipitó con etanol y acetato de amonio 0.3M a -20° C, posteriormente se centrifugó por 20 minutos y se botó el sobrenadante. El pellet se lavó con etanol al 70% y se volvió a centrifugar por 20 minutos. La muestra finalmente se resuspendió en 50µl de agua desionizada estéril.

3.- Técnica de PCR

La reacción de amplificación se realizó utilizando un termociclador PTC-100. La mezcla de la reacción contenía 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') a una concentración de 25 µM, 5µl de buffer de Taq polimerasa (que contiene 67mM de Tris-HCl pH 8.8, 16.6mM de (NH₄)₂ SO₄, 6.7mM de MgCl₂, 10 mM 2-mercaptoetanol.), 0,5µl de BSA 1%, 5µl (0.4mM) de los cuatro dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 4 unidades de Taq polimerasa (0,5µl), agua bidestilada hasta un volumen final de 50µl. Sobre esta mezcla se colocaron 50µl de aceite mineral, para así evitar la evaporación de los constituyentes.

El procedimiento de amplificación consistió en 2 ciclos iniciales de 98°C por 1 minuto y 64°C por 2 minutos; 33 ciclos intermediarios de 94°C por 1 minuto y 64°C por 1 minuto y un ciclo final de 72°C por 10 minutos. También en cada ensayo se hizo un control positivo, un marcador de peso molecular (DNA en escalera de 100 pb) y un control negativo de PCR donde el DNA de la muestra fue reemplazado por agua destilada. Luego 10µl del amplificado se mezclaron con 4µl de buffer de carga al igual que ambos controles y el marcador de peso molecular.

Para la visualización del producto amplificado que tiene un tamaño de 330 pb, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio, y se examinó en un transiluminador con filtro de luz ultravioleta. Al ver una única banda al mismo nivel que la banda 330 bp del marcador de peso molecular, indicaba la presencia de kDNA y en

consecuencia un resultado positivo de PCR (Botto-Mahan *et al.*, 2005; Rozas *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2007a).

4.- Xenodiagnóstico

Para realizar el xenodiagnóstico se debe tener previamente al vector sin alimentar por 30 a 45 días. El procedimiento en esta prueba se hizo de manera distinta según la especie en que se haga. En el caso de *O. cuniculus*, luego de colocar al animal en una jaula especial, se amarraron dos cajas, una en cada oreja con un número de 5 a 10 ninfas de triatomas por caja; una caja tenía *T. infestans* y la otra *M. spinolai*. Los *O. degus* se sedaron con ketamina a una dosis de 50mg/kg vía intramuscular y se colocaron en una bandeja que tenía ambas especies de vectores. Se pesaron las vinchucas antes y después del xenodiagnóstico, pues así por la diferencia de peso se calculó la cantidad de sangre que consumieron. Se usaron números variables de ambas vinchucas, para poder nivelar que el consumo total de sangre en ambas especies fuera similar.

Luego de 30 días con una leve presión del abdomen se examinó el contenido intestinal de las vinchucas, el cuál se recibió sobre un buffer PBS 1x pH 7,2. Luego se observó en un microscopio de luz con un aumento de x400. En caso que el resultado era negativo, este procedimiento se repetía también a los 60 días. Si el resultado del xenodiagnóstico daba positivo, se hacía un ensayo de PCR del contenido intestinal de las vinchucas. Este ensayo se hizo a todas las vinchucas que llegaban a los 60 días independiente del resultado del xenodiagnóstico. Para esto el material proveniente de las vinchucas se hirvió por 10 minutos con el objeto de fragmentar en parte los minicírculos de

kDNA, luego se diluyó con agua bidestilada y se centrifugó por 30 segundos a 14 x G. (Campos *et al.*, 2007a; 2007b).

Cada ensayo de PCR de sangre o de material intestinal de vinchucas se repitió un mínimo de 3 veces, llegando hasta 5 y 7 en algunas muestras dudosas o animales de muy baja parasitemia, esto último para descartar posible contaminación.

5.- Transferencia del DNA a membranas por simple difusión (Southern blotting)

Se realizó un gel con todos los resultados positivos de PCR el cual se sometió a incubación por dos veces en presencia de una solución de NaOH 0.5N y NaCl 1.5M por 20 minutos cada una. Posteriormente se neutralizó con una solución de Tris-HCl 1M pH 8,0 y NaCl 1,5 M por dos veces, con agitación constante por 20 minutos cada una. Finalizado este tratamiento, el gel se invirtió sobre un papel filtro Whatman 3MM saturado previamente con una solución SSC 2x (NaCl 3M, citrato de Na 0.3M) que sirve como puente. Sobre el gel invertido se puso la membrana de nylon y el papel absorbente. Todo el sistema se presionó con un peso de aproximadamente 1 kg por toda la noche para transferir el DNA por capilaridad desde el gel a la membrana de nylon. Después de terminada la transferencia el DNA se fijo a la membrana irradiando ésta última con luz UV por 1 minuto y luego se dejó secar (Southern, 1975).

6.- Preparación de la sonda

En este ensayo se ocuparon las sondas que detectan los linajes Tc I, Tc IId, Tc IIb y Tc IIe que fueron generadas desde clones de los parásitos sp104, NR, CBB y V195 respectivamente. Para confeccionar la sonda se sometió a PCR usando los primers CV1 y CV2 para cada uno de los clones a ocupar, según las condiciones descritas (Veas *et al.*, 1991). Una vez terminada la reacción el producto amplificado se digirió con enzimas de restricción (ScaI y Sau 96I) específicas, una por vez usando las condiciones del fabricante. Luego se visualizó el producto con una electroforesis en gel de agarosa al 2%, ya descrito anteriormente. Una vez comprobado que el fragmento tenía el tamaño adecuado, el producto se purificó previa electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y se eluyó la banda con un kit de purificación de DNA QIAGEN® dejando los fragmentos de DNA listos para la radiomarcación.

7.- Marcación radioactiva de la sonda

Las sondas de DNA kinetoplastídico fue marcada utilizando el kit de marcación Rediprime de Amersham®. Para esto se desnaturalizó el DNA por calentamiento y enfriamiento rápido en hielo. En un volumen final de 50µl la mezcla de reacción contenía además del DNA 2U del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, 5µl de dCTP marcado con P³², los nucleótidos dGTP, dATP y dTTP a 1 mM, oligonucleótidos al azar y tampón de reacción que viene en el kit. La incubación se hizo por 30 minutos, luego de lo cual se purificó la sonda marcada por cromatografía de exclusión en resina P6 (Solari *et al.*, 2001; Zulantay *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2007b).

8.- Hibridación con la sonda radiactiva

La membrana se prehibridó con 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 un frasco de hibridación a 55°C por 2 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 DNA marcada con P³² previamente desnaturalada. Las membranas se incubaron toda la noche 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 68° C, en una solución de SSC 0.1x y SDS 0.1% (condición de máxima estrictez). Finalmente la membrana se colocó en un chasis con una placa radiográfica para su posterior revelado en un cuarto oscuro, pasando primero por una solución de revelado por 5 minutos, y luego por una solución fijadora por otros 5 minutos dejándola secar a temperatura ambiente. Alternativamente se usó una pantalla cuantificadora en P-imager de Bio Rad® (Solari *et al.*, 2001; Zulantay *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2007b).

Los datos de este estudio fueron analizados por estadística descriptiva y prueba de independencia de chi cuadrado (χ^2).

RESULTADOS

1.- Detección de *T. cruzi*

Del total de *O. degus* se encontró ocho animales que fueron positivos, de estos solo dos fueron detectados por xenodiagnóstico con ambas especies de vectores. Estos dos últimos también resultaron positivos al PCR del contenido intestinal de las vinchucas ocupadas en el xenodiagnóstico. Los otros 6 roedores positivos se detectaron sólo por PCR del contenido intestinal de *M. spinolai*. Estos individuos resultaron negativos al xenodiagnóstico. De los ocho animales positivos 4 fueron descubiertos con el mínimo 3 ensayos de PCR, mientras que los otros cuatro fueron detectados con siete ensayos de PCR. Estos datos se resumen en la Tabla 1. Los ensayos realizados para detectar el kDNA en sangre fueron negativos.

Tabla 1: Resultados de los xenodiagnósticos realizados en *Octodon degus* con *Triatoma infestans* y *Mepraia spinolai*, PCR del contenido intestinal del vector y sangre del roedor.

N° de <i>O. degus</i>	XD con <i>T. infestans</i>	XD con <i>M. spinolai</i>	PCR deyecciones <i>T. infestans</i>	PCR deyecciones <i>M. spinolai</i>	PCR sangre
5	+	+	+	+	-
9	-	-	-	+	-
10	-	-	-	+	-
12	-	-	-	+	-
13	-	-	-	+	-
15	-	-	-	+	-
18	+	+	+	+	-
19	-	-	-	+	-

De los 33 *O. cuniculus* capturados no se encontró ninguno positivo al xenodiagnóstico, ni al PCR del contenido intestinal de vinchucas ni al de sangre.

Del análisis de los pesos de las vinchucas antes y después de realizar el xenodiagnóstico en los animales positivos se obtuvo que en promedio el consumo de sangre por xenodiagnóstico en *M. spinolai* fue de 128,8 mg, mientras que en *T. infestans* fue de 142,5 mg y la desviación estándar de estos datos fue de 60,26 y 77,08 respectivamente. Estos datos se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Resultado de los pesos de ambas especies de vinchucas antes y después de ser alimentadas en *Octodon degus* y N° de vinchucas ocupadas.

N° de <i>O. degus</i>	<i>T. infestans</i>			<i>M. spinolai</i>				
	N°	Peso sin alimentar	Peso alimentadas	Consumo	N°	Peso sin alimentar	Peso alimentadas	Consumo
5	10	50	170	120	16	32	150	118
9	6	30	110	80	11	22	80	58
10	6	30	120	90	10	20	90	70
12	5	25	130	105	13	26	130	104
13	5	25	140	115	12	24	170	146
15	6	30	130	100	13	26	130	104
18	6	60	310	250	6	60	260	200
19	6	60	340	280	6	60	290	230

Nota: Los pesos se expresan en miligramos

Al comparar los resultados del PCR del contenido intestinal de las vinchucas utilizadas en los xenodiagnósticos se observa que *M. spinolai* detecta un mayor número de positivos que *T. infestans* con un 22,9% y un 5,7% respectivamente (Tabla 3, fig. 1), por esto es que se utilizó la prueba de chi cuadrado para ver si esta diferencia es significativa estadísticamente o se deben al azar. El resultado de esta prueba con 1 grados de libertad y con una confianza de 95% es de 4,2 $P = 0,04$. Esto indica que las diferencias son significativas.

Tabla 3: *Octodon degus* infectados con *Trypanosoma cruzi* a través de PCR en muestras de sangre y contenido intestinal de ambas especies de vinchuca alimentadas con los roedores.

Muestra de DNA para PCR	<i>O. degus</i> infectados (%)	
	<i>T. infestans</i>	<i>M. spinolai</i>
Sangre	0/35 (0)	0/35 (0)
Contenido intestinal	2/35 (5,7)	8/35 (22,9)

2.- Genotipificación de *T. cruzi*

Los ensayos de hibridación demostraron que *M. spinolai* en el animal 18 detecta 2 linajes adicionales (Tc IIe y Tc I) al Tc IIb, en tanto que *T. infestans* detecta sólo el linaje Tc IIb. Además *M. spinolai* puede amplificar distintos linajes del parásito como se demuestra en los *O. degus* N° 9, 13, 18 y 19. Esto no se dió con *T. infestans* que sólo amplificaba una cepa del parásito en cada ensayo positivo. Estos datos se resumen en la Tabla 4 y Figura 1.

Tabla 4: Resultados de la hibridación del kDNA de *Trypanosoma cruzi* con las diferentes sondas de los genotipos Tc I, Tc IIb, Tc IIc y Tc IIe.

N° de <i>O. degus</i>	Vector ocupado	
	<i>M. spinolai</i>	<i>T. infestans</i>
5	Tc I	Tc I
9	Tc I, Tc IIc	0
10	Tc I	0
12	Tc I	0
13	Tc I, Tc IIc, Tc IIe	0
15	Tc I	0
18	Tc I, Tc IIb, Tc IIe	Tc IIb
19	Tc I, TcIIc	0

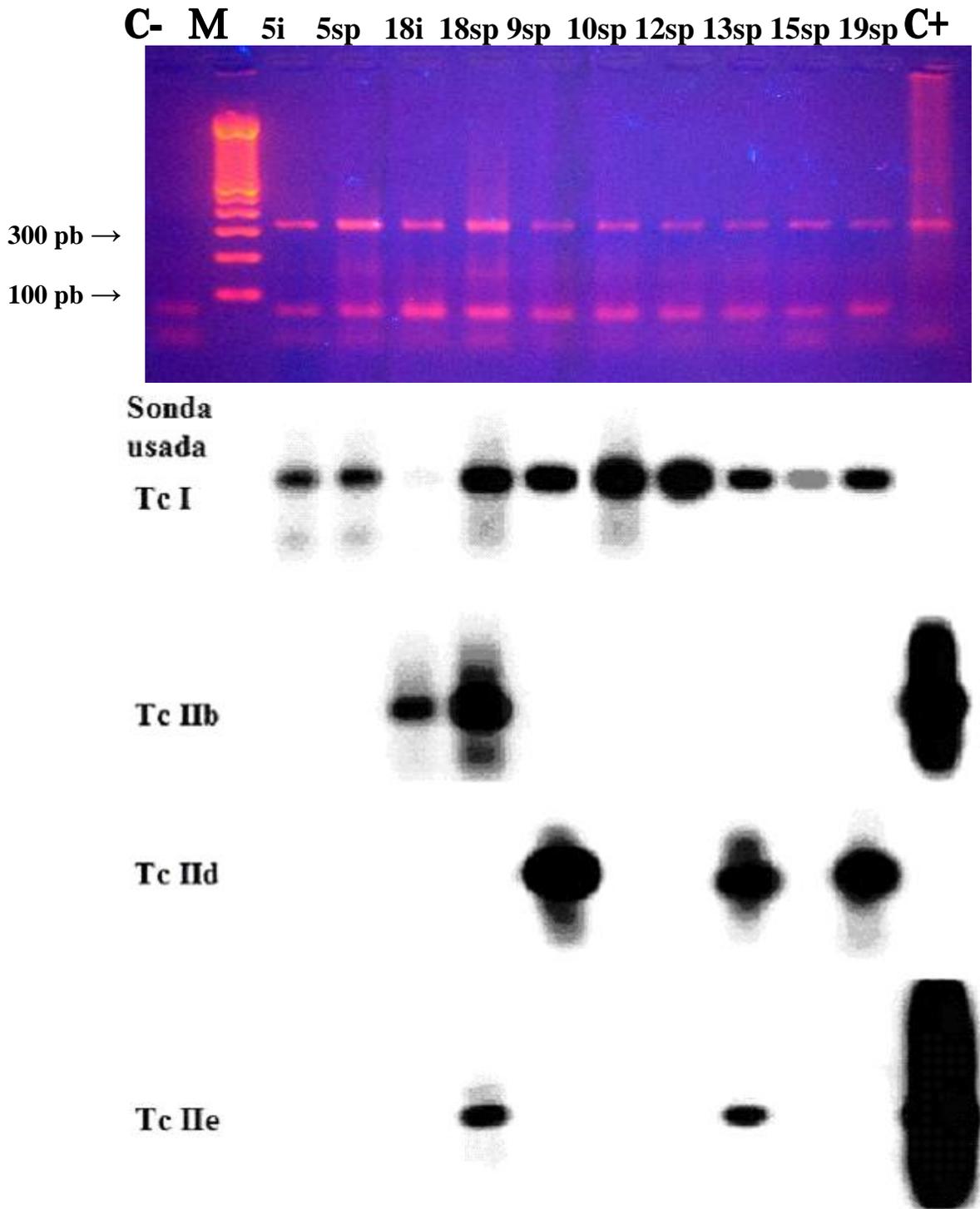


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio de las muestras positivas y Southern blot con las distintas sondas de los genotipos Tc I, Tc IIb, Tc IIc y Tc IIe. C- : control negativo. M: marcador de peso molecular. C+: control positivo. pb: pares de bases. 5i, 18i: *Triatoma infestans* alimentadas con *Octodon degus* N° 5 y 18. (5, 9, 10, 12, 13, 15, 18, 19)sp: *Mepraia spinoai* alimentada con el N° de roedor que indica.

DISCUSIÓN

La técnica de PCR para detectar la infección de *T. cruzi* sobre muestras de sangre ha demostrado ser sensible (Rozas *et al.*, 2005). Sin embargo, en este estudio no resultó suficiente para detectar al parásito en la muestra examinada. Esto se podría explicar por la ausencia de parásitos en la sangre colectada, lo que sugiere que el volumen de sangre es un importante factor a considerar en animales con una baja parasitemia. Otra explicación sería la presencia de inhibidores de la DNA polimerasa (Junqueira *et al.*, 1996). Sin embargo es importante considerar que las vinchucas utilizadas en el xenodiagnóstico amplifican al parásito circulante en el torrente sanguíneo permitiendo de mejor manera pesquisar el DNA de éste en el contenido intestinal de los vectores.

Los resultados también varían según el tiempo, ya que en el lugar de estudio ha bajado el porcentaje de positivos encontrados en *O. degus* (23%) al comparar los resultados con el porcentaje de infección encontrado en el mismo lugar algunos años atrás (42%) (Rozas *et al.*, 2005). Esto se puede deber a la fluctuación de poblaciones de roedores, vinchucas y del parásito en el ciclo silvestre. Dado que las vinchucas son hematófagos oportunistas, se ha visto que se alimentan principalmente del hospedero más abundante o del que esté presente, por ello se ha encontrado que *M. spinolai* se alimenta incluso de más de un hospedero a la vez (Molina *et al.*, 2004). Como las poblaciones de *O. degus* fluctúan en el tiempo (Meserve *et al.*, 1993; 1996; Lima *et al.*, 2003), eso explicaría que la vinchuca tenga una menor oportunidad de alimentarse de esta especie cuando su población está menguando y por lo tanto tenga una menor probabilidad de transmitir el *T. cruzi*.

(Molina *et al.*, 2004) encontró que un 67% de vinchucas provenientes de la Región Metropolitana se habían alimentado de *O. cuniculus*. Otro estudio demostró que las colonias de *M. spinolai* alimentadas con el conejo europeo mejoran sus parámetros poblacionales (fertilidad, sobrevivencia y peso promedio) al compararlo con colonias alimentadas con *O. degus* (Acuña, 2001). Sin embargo no se encontraron ejemplares de *O. cuniculus* positivos en este trabajo. Hay que considerar que los experimentos de Acuña (2001), se realizaron bajo condiciones de laboratorio en donde *M. spinolai* se vio obligada a alimentarse de un hospedero en particular, situación que no ocurre en la naturaleza viendo los hábitos oportunistas de estos insectos hematófagos.

Es probable sin embargo que otras técnicas de PCR más sensibles, como el nested PCR puedan detectar positivos en las muestras de sangre.

Estudios que comparan la capacidad de los vectores a la infección con *T. cruzi* han demostrado que *T. infestans* tiene una baja eficiencia vectorial en regiones endémicas de Brasil (Alejandre *et al.*, 1993; De Carvalho *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha demostrado que *T. infestans* no transmite los diferentes genotipos de *T. cruzi* con la misma eficiencia, encontrándose algunos de baja transmisibilidad (Nirschl *et al.*, 1994; De Lana *et al.*, 1998; Da Silveira *et al.*, 2000). Otros estudios revelan que *M. spinolai* tiene un mayor lapso de tiempo entre la alimentación y la deyección en comparación con *T. infestans* lo que permite inferir que el primero tiene una menor eficiencia vectorial (Canals *et al.*, 1999). Sin embargo, recientes estudios revelan que poblaciones de *M. spinolai* positivas a *T. cruzi*

cambian sus patrones de comportamiento, disminuyendo el tiempo entre alimentación y defecación, con lo cual se aumenta su transmisibilidad (Botto-Mahan *et al.*, 2006).

Respecto de la susceptibilidad de *M. spinolai* con los distintos linajes de *T. cruzi*, los ensayos de hibridación demostraron que *M. spinolai* en un animal detectó 2 linajes adicionales (Tc IIe y Tc I) a lo amplificado por *T. infestans* (Tc IIb). Además de poder combinar diferentes genotipos del parásito, esto no se dió en *T. infestans* que sólo amplificaba un genotipo del parásito en cada ensayo positivo. Esto nos permite explicar por que *M. spinolai* detecta más animales positivos que *T. infestans*, es decir, esto se debería a la mayor capacidad que tiene este vector de amplificar distintos genotipos del parásito y poder mantener infecciones mixtas en un mismo vector. En resumen el vector autóctono es más apropiado para amplificar *T. cruzi*, permitiendo a este vector propagar de mejor manera los distintos linajes del parásito en la naturaleza. Esto podría ser explicado por el hecho que *M. spinolai* ha tenido un mayor tiempo de coevolución con *T. cruzi* en el ciclo silvestre, respecto de *T. infestans* (Briones *et al.*, 1999). Se requeriría estudiar un mayor número de roedores positivos con ambas especies de vinchucas para avalar nuestra observación. Para esto se tendría que aumentar el número de roedores capturados y vinchucas ocupadas.

Lo importante de este estudio es que se desarrolla en la línea de investigación de los vectores silvestres de la enfermedad de Chagas en Chile de la cual no se sabe mucho, dejando de esta manera un aporte al conocimiento de la transmisión de esta enfermedad en el ciclo silvestre.

CONCLUSIONES

- de acuerdo con la hipótesis 1 los porcentajes de infección son mayores en *O. degus* que en *O. cuniculus* por lo que se acepta esta hipótesis.

- de acuerdo con la hipótesis 2 los resultados del xenodiagnóstico realizados con *M. spinolai* son distintos a los resultados realizados con *T. infestans* por lo que también se acepta esta hipótesis.

- Según los objetivos específicos de este estudio sí fue posible detectar el kDNA de *T. cruzi* en *O. degus*, pero sólo con las muestra del contenido intestinal de las vinchucas ocupadas en el xenodiagnóstico. El porcentaje de positividad fue de 22,86% y 5,7% detectado con *M. spinolai* y *T. infestans* respectivamente. Sin embargo no se encontró ningún *O. cuniculus* positivo.

- Al comparar los resultados del xenodiagnóstico se concluye que el vector *M. spinolai* detecta más positivos que *T. infestans* y que es un mejor vector que *T. infestans* en el ciclo silvestre. Esto se explicó por los resultados de los ensayos de hibridación que demostraron que *M. spinolai* es capaz de propagar más linajes de *T. cruzi* y a su vez capaz de combinarlos en un mismo insecto.

REFERENCIAS

- **ACUÑA, M.** 2001. Efecto del hospedero sobre el crecimiento poblacional de *Mepraia spinolai*. Tesis para optar al grado de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Santiago, Chile. P 67.
- **ALEJANDRE, R.; NOGUEDA, B.; CALVO, ML.; CORTEZ, M.** 1993. Comparative study of the susceptibility of 5 triatomine species (Insecta: Reduviidae) to *Trypanosoma cruzi* infection. Rev. Latinoam Microbiol. 35 (2): 201-6.
- **APT, W.; REYES, H.** 1990. Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. Parasitol. al Día. 14: 23-40.
- **ATIÁS, A.** 1998. Enfermedad de Chagas. Triatomas, Chinchas y Cucarachas. En: Parasitología Médica. Atias, A. Primera edición. Editorial Mediterráneo. Santiago. Chile. PP: 251-264; 477-483.
- **ATIÁS, A.; APT, W.** 1991. Enfermedad de Chagas. En Atias A.; Neghme, A. Parasitología Clínica. 3ª Ed. Santiago de Chile. Ed. Mediterráneo. 255-258.
- **BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ROZAS, M.; CATTAN, P.; SOLARI, A.** 2005 DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in the Chilean wild vector *Mepraia spinolai*. Rev. Mem. Ins. Oswaldo Cruz. Río de Janeiro. 100 (3): 237-239.
- **BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN, PE.; MEDEL, R.** 2006. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. Acta Trop. 98 (3): 219-23.
- **BRIONES, MR.; SOUTO, RP.; STOLF, BS.; ZINGALES, B.** 1999. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. Mol Biochem Parasitol. 104 (2): 219-32.
- **BRISSE, S.; BARNABE, C.; TIBAYRENC, M.** 2000a. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int. J. Parasitol. 30 (1): 35-44.

- **BRISSE, S.; DUJARDIN, J.C.; TIBAYRENC, M.** 2000b. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. Mol. Biochem. Parasitol. 111(1):95-105.

- **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.

- **BURCHARD, L.; CACERES, J.; SAGUA, H.; BAHAMONDE, M.; NEIRA, I.; ARAYA, J.; GOYCOLEA, M.** 1996. Estado actual de la seroprevalencia de la infección chagásica humana y canina en la comuna de San Pedro de Atacama, II Región de Antofagasta, Chile, 1995. Bol. Chil. Parasitol. 51: 76- 96.

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

- **CANALS, M.; SOLIS, R.; TAPIA, C.; EHRENFELD, M.; CATTAN, PE.** 1999. Comparison of Some Behavioral and Physiological Feeding Parameters of *Triatoma infestans* Klug, 1834 and *Mepraia spinolai* Porter, 1934, Vectors of Chagas Disease in Chile. Rev. Mem. Ins. Oswaldo Cruz. 94 (5): 687-692.

- **CANALS, M.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.** 2000. Situación de *Mepraia spinolai* vector silvestre de la enfermedad de Chagas en Chile, en relación con otros vectores desde la perspectiva de sus fuentes de alimentación. Rev. Med. Chile. 128: 1108-1112.

- **CAMPOS, R.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ACUÑA, M.; CATTAN, P.; SOLARI, A.** 2007a. *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.; ACUÑA, M.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.; SOLARI, A.** 2007b. Susceptibility of *Mepraia spinolai* and *Triatoma infestans* to different *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected rodent hosts. Acta Trop. En prensa.

- **DA SILVEIRA, A.; DE LANA, M.; BRITTO, C.; BASTRENTA, B. TIBAYRENC, M.** 2000. Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. *Int. J. Parasitol.* 30 (7): 843-848.

- **DE CARVALHO, CJ.; PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A.** 1997. Attempts to Improve Xenodiagnosis: Comparative Test of Sensibility Using *Rhodnius neglectus*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma vitticeps* and *Triatoma infestans* in Endemic Areas of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 92 (1): 91-96.

- **DE LANA, M.; DA SILVEIRA PINTO, A.; BARNABE, C.; QUESNEY, V.; NOEL, S.; TIBAYRENC, M.** 1998. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol.* 1998. 90 (1):20-5.

- **DE SOUZA, W.** 2000. O parasito e sua interacao con os hospedeiros. En *Trypanosoma cruzi* e doenca de Chagas. *Brener Z.* 2ª Edición. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. Brasil. 88-126.

- **DURAN, J.; VIDELA, M.; APT, W.** 1989. Enfermedad de Chagas en una comunidad de pequeños mamíferos simpátricos de la reserva nacional de las Chinchillas. *Parasitol. al Día.* 13: 15-20.

- **FRIAS, D.; HENRY, A.; GONZALEZ, C.**1998. *Mepraia gajardoi* una nueva especie de triatominae (Hemiptera: Reduviidae) para Chile y su comparación con *Mepraia spinolai* (Porter, 1934). *Rev. Chil. His. Nat.* 71: 177-188.

- **JUNQUEIRA, AC.; CHIARI, E.; WINCKER, P.** 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90 (2):129-32.

- **KITCHIN, P.; KLEIN, V.; ENGLUD, P.** 1985. Intermediates in the replication of kinetoplast DNA minicircles. *Rev. J.Biol. Chem.* 260: 3844-3851.

- **LIMA, M.; STENSETH, N.; LEIRS, H.; JAKSIC, M.** 2003. Population dynamics of small mammals in semi-arid regions: a comparative study of demographic variability in two rodent species. *Proc. R. Soc. Lond.* 270: 1997-2007.

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

- **MESERVE, P.; GUTIÉRREZ, J.; YUNGER, J.; CONTRERAS, L.; JAKSIC, F.** 1996. Role of Biotic Interactions in a Small Mammal Assemblage in Semiarid Chile. *Ecology*. 77: 133-148.

- **MILES, M.A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW J.J.; LIINSON, R.; TOYE, P.J.** 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient With Chagas disease in amazonian Brazil. *Nature*. 272 (5656): 819-21.

- **MOLINA, MC.; CATTAN, P.; CANALS, M.; CRUZAT, L.; AGUILLON, JC.; FERREIRA, A.** 2004. A simple immunometric assay to assess the feeding habits of *Meprai spinolai*, a *Trypanosoma cruzi* vector. *Parasitol Res*. 92 (5): 375-9.

- **NIRSCHL, RA.; SOARES, JM.; PIRANI, EM.; FRANCISCON, JU.; RAMIREZ, LE.** 1994. Susceptibility of *Triatoma infestans* to various strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from chagasic patients from the Triangulo Mineiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 27 (4): 235-9.

- **OPS/OMS.** 2003. XIIª Reunión de la comisión intergubernamental del cono sur para la eliminación de *Triatoma infestans* y la interrupción de la transmisión transfusional de la Tripanosomiasis americana (INCOSUR/Chagas). Santiago, Chile: World Health Organization.

- **ORDENES, H.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.; CANALS, M.** 1996. Infección Tripano-triatomino de *Triatoma spinolai* en una zona de riesgo epidemiológico. *Rev. Med. Chil*. 124: 1053-57.

- **OSTE, C.** 1988. Polymerase chain reaction. *Biotechniques*. 6: 162-167.

- **RAY, D. S.** 1989. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. *Mol. Cell. Biol*. 9: 1365-1367.

- **RIOS, A.; ALCAINO, H.; APT, W.** 1986. Enfermedad de Chagas en caninos, bovinos y equinos sinantrópicos, de la provincia del Limarí, Chile. *Parasitol. al Día*. 10: 40-45.

- **RIOU, G.; PAUTRIZEL, R.**1969. Nuclear and kinetoplast DNA from trypanosomae. J. Protozool. 16: 509-513.

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

- **SCHENONE, H.; ALFARO, E.; ROJAS, A.** 1974. Bases y rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica humana. Bol. Chile. Parasitol. 29: 24-30.

- **SCHOFIELD, C. J.** 1994. Triatominae: Biología y Control. 1994. Eurocommunica Publications Ed. U.K. p 76- 80.

- **SCHUMUÑIS, G.** 1991. *Trypanosoma cruzi* the etiologic agent of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and non endemic countries. Transfusion 31: 547-557.

- **SHELINE, C.; RAY, D.S.** 1989. Specific discontinuities in *Leishmania tarentolae* minicircles map within universally conserved sequence blocks. Mol. Biochem. Parasitol. 37: 151-158.

- **SIMPSON, L.** 1987. The mitochondrial genome of kinetoplast protozoa: genomic organization, transcription; replication and evolution. Ann. Rev. Microbiol. 41: 363-382.

- **SOLARI, A.; CAMPILLAY, R.; ORTIZ, S.; WALLACE, A.** 2001. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. Exp Parasitol. 97 (4): 226-33.

- **SOUTHERN, E.M.** 1975. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J.Mol.Biol. 98: 503-517.

- **STURN, N.; SIMPSON, L.** 1990. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. Rev. Cell 61: 879-884.

- **ULLOA, M.; TRASLAVIÑA, M.; ALCAINO, H.; APT, W.; SANDOVAL, J.** 1989. Enfermedad de Chagas en caninos y caprinos sinantrópicos de la provincia del Choapa, IV región, Chile. *Parasitol. al Día.* 13: 120-124.

- **VEAS, F.; BRENIERE, SF.; CUNY, G.; BRENGUES, C.; SOLARI, A.; TIBAYRENC, M.** 1991. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Cell Mol Biol.* 37 (1) :73-84.

- **WESTENBERGER, S.J.; BARNABE, C.; CAMPBELL, D.A.; STURM, N.R.** 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171:527-43.

- **WHITING, C.** 1946. Contribución al estudio de las reservas de parásitos en la enfermedad de Chagas en Chile. I. Primeros hallazgos en Chile de mamíferos silvestres naturalmente infectados por el *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Chil. Hig. Med. Prev.* 8: 69-102.

- **ZULANTAY, I.; HONORES, P.; SOLARI, A.; APT, W.; ORTIZ, S.; OSUNA, A.; ROJAS, A.; LOPEZ, B.; SANCHEZ, G.** 2004. Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. *Diagn Micr Infec Dis.* 48: 253-257.