



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

DETERMINACIÓN DEL PERFIL ALIMENTARIO DE
TRIATOMINOS SILVESTRES EN ZONAS ENDÉMICAS DE
CHILE

FRANCISCO JAVIER CHACÓN OLIVOS

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

PROFESOR GUÍA: GALIA RAMÍREZ TOLOZA

SANTIAGO, CHILE
2016



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

DETERMINACIÓN DEL PERFIL ALIMENTARIO DE
TRIATOMINOS SILVESTRES EN ZONAS ENDÉMICAS DE
CHILE

FRANCISCO JAVIER CHACÓN OLIVOS

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

NOTA FINAL:

FIRMA

PROFESOR GUÍA : GALIA RAMÍREZ TOLOZA

.....

PROFESOR CONSEJERO: PEDRO CATTAN

.....

PROFESOR CONSEJERO: CRISTÓBAL BRICEÑO

.....

SANTIAGO, CHILE
2016

MEMORIA DE TÍTULO

“DETERMINACIÓN DEL PERFIL ALIMENTARIO DE TRIATOMINOS SILVESTRES EN ZONAS ENDÉMICAS DE CHILE”

“DETERMINATION OF THE ALIMENTARY PROFILE OF SYLVATIC TRIATOMINES IN ENDEMIC AREAS OF CHILE”

Francisco Javier Chacón Olivos *

* Unidad de Parasitología, Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Financiamiento

Este trabajo ha sido financiado de forma parcial por el Proyecto FONDECYT Regular N° 1100339 y por el Proyecto FONDECYT Iniciación N° 11110251

1. Resumen

La tripanosomiasis americana es una enfermedad crónica transmitida principalmente por vectores. Estos vectores triatominos hematófagos transmiten *Trypanosoma cruzi* a una amplia variedad de mamíferos, que por lo general son su fuente de alimento. Esta Memoria de Título tuvo como objetivo determinar el perfil de la alimentación de *Mepraia spinolai*, un vector triatomino silvestre, presente en zonas endémicas de Chile. Los insectos fueron capturados en las regiones de Coquimbo, Valparaíso y Metropolitana. Las muestras de contenido intestinal fueron analizadas por un ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA) estandarizado en este estudio, que identifica y discrimina la presencia de antígenos séricos de *Homo sapiens sapiens* y nueve especies de animales (*Canis familiaris*, *Felis catus*, *Capra hircus*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Octodon degus*, *Thylamys elegans*, *Phyllotis darwini* y *Oryctolagus cuniculus*). Los anti-sueros contra estas especies se utilizaron a diluciones de 1: 40.000 a 1: 800.000, seguido de una IgG de cabra anti-conejo (anticuerpo secundario) diluido 1: 2000, y la adición del sustrato azino-bis 3-etilbenzotiazolin- 6-ácidosulfónico (ABTS). Las absorbancias se leyeron a 405 nm de longitud de onda en un lector de ELISA (Bio-Rad®). Los resultados se expresaron en forma descriptiva en frecuencias. Nuestros resultados indican que la fuente de alimentación más frecuente en esta área fue *P. darwini*, seguido de *O. degus*, *O. cuniculus*, *M. musculus*, *G. gallus*, *T. elegans*, *C. familiaris*, *F. catus* y *C. hircus*. También se identificaron las fuentes de alimentación mixtas.

Palabras Clave: Triatomino silvestre, antígenos séricos, perfil alimentario, Enfermedad de Chagas.

2. Abstract

American trypanosomiasis is a chronic disease transmitted mainly by vectors. The hematophagous triatomine vectors transmit *Trypanosoma cruzi* to a wide variety of mammals, which usually are their food source. This Undergraduate Thesis aimed to determine the feeding profile of *Mepraia spinolai*, a sylvatic triatomine vector, present in endemic areas of Chile. The insects were captured in the regions of Coquimbo, Valparaiso and Metropolitana. Samples of intestinal contents were analyzed by an Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) standardized in this study, that identifies and discriminates the presence of serum antigens from *Homo sapiens sapiens* and nine animal species (*Canis familiaris*, *Felis catus*, *Capra hircus*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Octodon degus*, *Thylamys elegans*, *Phyllotis darwini* and *Oryctolagus cuniculus*). Anti-sera against these animals were used at dilutions of 1: 40,000 to 1: 800,000, followed by a secondary goat anti-rabbit IgG diluted 1: 2000, and the addition of azino-bis substrate 3-ethylbenzotiazolin- 6-ácidosulfónico (ABTS). The absorbances were read at 405 nm wavelength on an ELISA reader (Bio-Rad®). The results were descriptively expressed in frequencies. Our data indicate the most frequent feeding source in this area was *P. darwini*, followed by *O. degus*, *O. cuniculus*, *M. musculus*, *G. gallus*, *T. elegans*, *C. familiaris*, *F. catus* and *C. hircus*. Mixed food sources were also identified.

Keywords: sylvatic triatomine, seric antigens, food source, Chagas disease.

3. Introducción

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es una enfermedad parasitaria crónica y potencialmente mortal, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Este se transmite a los seres humanos principalmente por las deyecciones de insectos triatomíneos (Hemiptera: *Reduviidae*: subfamilia *Triatominae*) conocidos en Chile como vinchucas. Se calcula que en el mundo hay entre 6 a 7 millones de personas infectadas, la mayoría de ellas en América Latina, donde la enfermedad se considera endémica (WHO, 2015). La distribución geográfica de la enfermedad de Chagas se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta la región central de Argentina y Chile (Toso *et al.*, 2011; WHO, 2015). En nuestro país, el área endémica abarca desde la Región de Arica y Parinacota hasta a la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, incluyendo a la Región Metropolitana (Apt *et al.*, 2008).

Trypanosoma cruzi infecta un amplio rango de hospederos (alrededor de 150 especies de mamíferos), tanto silvestres como domésticos. Presenta al menos 4 formas en su ciclo vital: tripomastigote metacíclico (forma encontrada en deyecciones del vector), tripomastigote (forma circulante en el hospedero), amastigote (forma replicativa intracelular en el hospedero) y epimastigote (forma replicativa presente en el intestino medio del vector). Actualmente, *T. cruzi* se clasifica en 6 linajes o unidades discretas de tipificación o DTU (del inglés *Discrete Unit of Typification*), TcI a TcVI (Arenas *et al.*, 2012; Schofield, 2000).

El parásito se transmite a través de alimentos contaminados (principalmente jugos de caña de azúcar o acai), transfusión de sangre proveniente de individuos infectados, transmisión de la madre infectada a su hijo durante el embarazo o el parto, trasplante de órganos provenientes de una persona infectada o por accidentes de laboratorio. Sin embargo, la vía vectorial sigue siendo la de mayor significancia epidemiológica a nivel mundial, alcanzando un 80% de la incidencia total. En esta forma de transmisión, el parásito se transmite por las deyecciones infectadas de triatomíneos (Schofield, 1994; WHO, 2015).

En Chile se han descrito 4 especies de triatomíneos: *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai*, *Mepraia gajardo* y *Mepraia parapatrica*. Todos ellos ocupan distintos ecotopos, tanto silvestres como peridomésticos, que abarcan en su distribución desde el extremo norte del país (*M. gajardo*), norte grande (*T. infestans*, *M. spinolai* y *M. parapatrica*) hasta la zona central (*T. infestans* y *M. spinolai*) (Apt *et al.*, 2008; Frias *et al.*, 1995; Schofield, 2000).

Triatoma infestans es el principal vector de la enfermedad en Sudamérica. Dado que se adaptó a la vivienda humana y sus condiciones (Noireau *et al.*, 2000; WHO, 2015), es el principal vector asociado al ciclo domiciliario y peridomiciliario en Chile (Apt y Reyes, 1990; Schofield, 1994). En nuestro país se ha realizado un control exhaustivo de este vector a través del uso de insecticidas, logrando la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad en 1999 (Lorca *et al.*, 2001; WHO, 2000).

Mepraia spinolai, vector asociado en el ciclo silvestre de la enfermedad de Chagas, vive en ecotopos tales como colinas, terrenos pedregosos, nidos de aves, grietas, agujeros (Apt y Reyes, 1990) y ocasionalmente se ha encontrado en edificios rústicos (Schenone *et al.*, 1980). Es principalmente un insecto diurno (Canals *et al.*, 1998) y hematófago estricto (Lent y Wygodzinsky, 1979; Maekelt, 1983), que consume sangre de los animales disponibles en su entorno, mostrando una estrategia de “sentarse y esperar” (Botto-Mahan *et al.*, 2005; Schofield, 1994). Esto demuestra una dependencia entre los vectores, el medio y sus posibles fuentes de alimentación (Apt y Reyes, 1990; Schenone *et al.*, 1985). Similar a *T. infestans*, *M. spinolai* tiene la capacidad potencial de invadir viviendas humanas, cuando el humano invade el hábitat de los triatominos, o a la inversa, cuando *M. spinolai* invade el espacio doméstico, luego de la eliminación de los vectores domiciliarios (Apt y Reyes, 1990; Canals *et al.*, 1994; Salvatella *et al.*, 1995).

Los triatominos, en general, presentan un aumento en el tamaño de sus poblaciones durante los meses de verano, lo que podría originar la invasión hacia el peridomicilio por triatominos silvestres. Si su porcentaje de infección con *T. cruzi* es alto, la probabilidad de infección de mamíferos domésticos o sinantrópicos sería a su vez elevada (Cruzat, 1997). Esto depende de varios factores, entre ellos de la capacidad vectorial de cada triatomo (Canals *et al.*, 1998). Se ha descrito la prevalencia de *T. cruzi* en distintas especies silvestres, principalmente micromamíferos (donde *O. degus* tiene una mayor proporción de infección) (Botto-Mahan *et al.*, 2012; Botto-Mahan *et al.*, 2010).

El conocer el perfil alimentario de los triatominos permitiría determinar posibles preferencias por hábitats peridomésticos y su posible incursión en la vivienda humana (Salvatella *et al.*, 1995). Varios ejemplos han demostrado que la invasión humana de los ambientes silvestres, contactan a humanos con vectores silvestres. Así, se han encontrado ejemplares de *M. spinolai* positivos a *T. cruzi* en viviendas del Observatorio Astronómico de La Silla en la IV región, lugar que se encuentra sobre los 2000 metros de altura. Estos inicialmente se alimentaban de zorros y roedores silvestres, pero 10 años después se

capturaron ejemplares que se alimentaban íntegramente de sangre humana (Schenone *et al.*, 1985; Schenone *et al.*, 1980).

En una localidad ubicada a 15 Km. al norte de Santiago (canteras de Colina), pertenecientes a la Región Metropolitana, se capturaron 130 ejemplares de *M. spinolai*. Utilizando un ensayo inmunorradiométrico (IRMA), capaz de detectar antígenos séricos de distintas especies animales en las deyecciones de triatominos, fue posible reconocer la fuente de alimentación en un 43% del total de muestras. La fuente de alimentación más detectada fue conejo (76,8%), seguido de perro, cabra, ratón, humano y ave (Canals *et al.*, 2001; Cruzat, 1997; Molina *et al.*, 2004).

Otro estudio realizado por Rengifo (2000), analizó 211 ejemplares de *M. spinolai*, capturados en el sector de Colina y Auco (invierno y verano), mediante una técnica similar. Ochenta y nueve muestras fueron positivas a alguna de las especies analizadas, y 25 fueron positivas a antígenos séricos de humano. En Auco, más del 50% de las muestras fueron positivas a lauchón (en verano) y un 18% a humano (invierno y verano), mientras que, en Colina, más del 50% fue positivo a conejo y más del 20% a lauchón.

Ambos estudios utilizaron dos técnicas inmunoenzimáticas distintas: IRMA (Canals *et al.*, 2001; Cruzat, 1997; Molina *et al.*, 2004) y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) (Rengifo, 2000). En ambos se generaron y utilizaron distintos paneles de antisueros contra antígenos séricos de animales domésticos y silvestres, lo cual impide comparar estos estudios.

La presente Memoria de Título tuvo como objetivo caracterizar el perfil alimentario de triatominos silvestres en zonas endémicas de Chile. Para ello se utilizó un ELISA capaz de detectar 10 especies animales en las deyecciones de insectos triatominos. Para la detección se utilizó un panel de 9 antisueros, generados en trabajos previos (Cruzat, 1997; Rengifo, 2000) más un anticuerpo policlonal comercial. La concentración de antisueros utilizados fue estandarizada en el contexto de esta Memoria, resultando altamente sensible y específica. Esta información puede aportar importantes antecedentes sobre la interacción de los insectos vectores y animales domésticos, sinantrópicos y/o silvestres característicos de la zona centro norte de Chile, generando información crucial para la determinación de la capacidad vectorial de los triatominos silvestres de la zona en estudio.

4. Materiales y método

4.1. Áreas de recolección y captura

Se utilizaron 173 muestras de deyecciones de *M. spinolai* y *T. infestans* capturados durante los años 2011, 2012 y 2013 en las comunas de: Monte Patria e Illapel (Región de Coquimbo); Petorca y Putaendo (Región de Valparaíso) y Til-Til (Región Metropolitana).

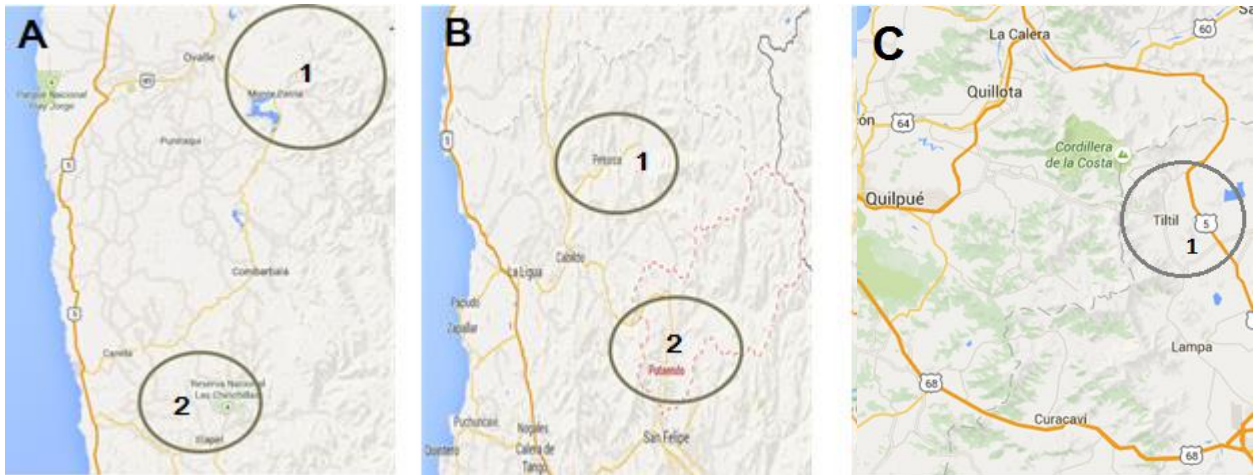


Figura 1. Comunas de recolección y captura de insectos triatominos. A. Monte Patria (A.1) e Illapel (A.2), en la región de Coquimbo; **B.** Petorca (B.1) y Putaendo (B.2), de la región de Valparaíso); **C.** Til-Til (C.1) en la región Metropolitana.

4.2. Obtención de deyecciones de triatominos

Las muestras fueron obtenidas por medio de compresión intestinal, siguiendo el protocolo utilizado por Schenone *et al.* (1985; 1980) y bajo estrictas condiciones de bioseguridad (Anexo 1). Se obtuvieron aproximadamente 5 μ L de contenido intestinal de cada triatomino, los cuales fueron diluidos y almacenados en aproximadamente 50 μ l de buffer Na_2CO_3 0,1M pH 9,6, hasta su utilización en ELISA.

4.3. Estandarización de un método de ELISA para detección de antígenos séricos

Se utilizaron 9 sueros de distintos animales domésticos, sinantrópicos y silvestres: *Canis familiaris* (perro), *Felis catus* (gato), *Homo sapiens sapiens* (humano), *Capra hircus* (cabra), *Mus musculus* (ratón), *Gallus gallus* (gallina), *Thylamys elegans* (yaca), *Octodon degus*

(degu) y *Phyllotis darwini* (lauchón orejudo) y 9 antisueros generados en conejos dirigidos contra antígenos séricos de las mismas especies antes mencionadas. Los antisueros utilizados fueron generados en el contexto de 2 Memorias de Título (Cruzat, 1997; Rengifo, 2000).

Placas de polivinilo de 96 pocillos de fondo plano, fueron sensibilizadas con 100 µL de cada suero, diluidos 1:100.000 (aproximadamente 60 ng/mL de inmunoglobulina total) en buffer o tampón fosfato salino (PBS) e incubadas toda la noche a 4°C. A continuación, cada pocillo se lavó cuatro veces con una solución detergente de PBS - 0,05 % TWEEN 20®, proceso que se repitió finalizada cada incubación. Posterior al primer lavado, se realizó un bloqueo de los sitios activos remanentes, agregando 200 µL de una solución PBS - 3% albúmina sérica bovina (BSA) por pocillo e incubando a 37° C por dos horas. Luego de un segundo lavado, se agregaron los antisueros anti cada especie animal en diluciones seriadas de 1:40.000 a 1:800.000 en PBS-BSA - 3%. Estos fueron incubados por 1 hora a 37° C. Cada anti-suero fue enfrentado a los sueros de las distintas especies animales testeadas en esta memoria, siguiendo el patrón que se muestra en el Anexo 2. Una vez terminada la incubación, la placa se sometió a un nuevo lavado para agregar un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa diluido en 1:2.000. Finalmente, luego de una incubación de 1 hora a 37° C, los pocillos fueron lavados y se les adicionó 100 µL del sustrato azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-ácidosulfónico (ABTS). Después de 15 minutos, las absorbancias fueron leídas a 405 nm en un lector de ELISA, previa agitación de 10 segundos. Como controles positivos para validar los ELISA, algunos pocillos se sensibilizaron con una dilución de 1:100.000 de IgG de *O. cuniculus*, y como control negativo, algunos pocillos fueron sensibilizados con una solución Buffer de Na₂CO₃, 0,1M, pH 9,6, la cual fue utilizada en la conservación de las muestras fecales de los triatomos y una solución PBS-3%BSA.

Las diluciones que fueron utilizadas para el resto de los ensayos, fueron aquellas capaces de reconocer específicamente los antígenos séricos de la especie para la cual fue generado y su reactividad contra las otras especies fue menor o igual a 0,2 nm, criterio utilizado en una Memoria de Título previa (Rengifo, 2000).

Los antisueros que no resultaron específicos (reactividad cruzada con otras especies animales) fueron purificados mediante inmuno-adsorción en placas de polivinilo de 96 pocillos. Para esto, las placas fueron sensibilizadas con el suero con el cual se presentó reactividad cruzada. Las placas fueron bloqueadas con una solución PBS-BSA 3% e

incubadas a 37°C por 1 hora. Posteriormente, se agregó 100 µL del antisuero diluido en PBS-BSA 3% en una primera columna y se incubó 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, el contenido de los pocillos fue trasladado a la columna siguiente. Esta ronda de incubación se repitió 3 veces, para finalmente recolectar el contenido de todos los pocillos, formando un *pool* de antisuero inmuoabsorbido. Los distintos antisueros inmuoabsorbidos fueron nuevamente titulados hasta encontrar la dilución específica (sin reactividad cruzadas) (Anexo 3).

4.4. Identificación del perfil alimentario de triatominos mediante la detección de antígenos séricos en sus deyecciones

La identificación de antígenos séricos se realizó mediante el ELISA previamente estandarizado (sección 4.3.).

Cincuenta microlitros de cada muestra (contenido intestinal) fueron diluidos en 950 µL de PBS. Diez pocillos una placa de polivinilo de 96 pocillos fueron sensibilizadas con 100 µL de esta solución. Como control positivo, un pocillo fue sensibilizado con 100 µL de una dilución 1:100.000 de un suero de conejo. Como control negativo, un pocillo se sensibilizó con 100 µL de PBS-BSA al 3%. Este procedimiento fue repetido con cada muestra. La placa de polivinilo fue incubada a 37° C por dos horas y luego lavadas cuatro veces con una solución de PBS-TWEEN 20, 0,05%. Para el bloqueo, las placas se incubaron por 2 horas a 37°C con 200 µL de una solución de PBS-BSA 3% por pocillo. Luego, se lavaron y se agregaron 100 µL de un antisuero primario a cada pocillo en una dilución fija, previamente estandarizada (las diluciones se detallarán en la sección de resultados) (Anexo 4) para ser incubadas por 1 hora a 37°C. Una vez finalizada la incubación, las placas se lavaron y se agregó a cada pocillo 100 µL de una dilución 1:2.000 de un anticuerpo IgG de cabra anti-IgG conejo conjugado a peroxidasa (Dako 488®) para nuevamente ser incubada por 1 hora a 37°C. La presencia de antígenos séricos de conejo fue detectada utilizando este mismo anticuerpo secundario comercial. Finalmente, la placa fue lavada (esta vez 5 veces por cada pocillo) y se agregaron 100 µL de la solución sustrato para peroxidasa ABTS a cada pocillo, para ser leída a 405 nm en un lector de ELISA (Bio-Rad ®).

4.5. Análisis de Resultados

Las reacciones fueron calificadas como positivas mediante un valor de corte, mayor o igual a dos desviaciones estándar promedio de los controles negativos (valor aproximado de 0,2 nm en valores de absorbancia). Los resultados obtenidos fueron expresados de forma descriptiva, identificando las deyecciones analizadas que resultaron positivas a los antisueros probados.

4.6. Bioseguridad

La presente Memoria cuenta con un certificado de Bioseguridad aprobado por la Comisión de Bioseguridad Local (Anexo 1).

Debido a la posible contaminación con *T. cruzi* de las vinchucas colectadas, todo el manejo en laboratorio, tanto para la obtención de las muestras, la sensibilización de las placas, como en el procesamiento de las mismas, fue realizado bajo normas de seguridad que disminuyen al máximo los riesgos de contaminación accidental.

5. Resultados

5.1. Los antisueros contra distintas especies animales reaccionan de manera especie-específica contra un suero homólogo.

Se realizaron ensayos de ELISA para estandarizar una dilución que permitiera reconocer antígenos séricos de cada especie animal de manera específica (sin reactividad cruzada con especies filogenéticamente relacionadas). Para esto, cada antisuero fue aplicado de manera seriada y en diluciones crecientes a pocillos de una placa de ELISA sensibilizados con sueros de 9 animales distintos.

Antes de finalizar la estandarización, se obtuvieron lecturas que indicaban que 6 antisueros (anti-humano, -cabra, -gallina, -degu, -yaca y -lauchón) resultaron ser específicos para sus antígenos séricos homólogos (Figura 1), en una dilución determinada. Cada antisuero es capaz de reconocer específicamente a cada uno de los sueros homólogos en las siguientes diluciones: 1:512.000 (Figura 1A), 1:64.000 (Figura 1B); 1:56.000 (Figura 1C), 1:40.000 (Figura 1D), 1:64.000 (Figura 1E) y 1:120.000 (Figura 1F).

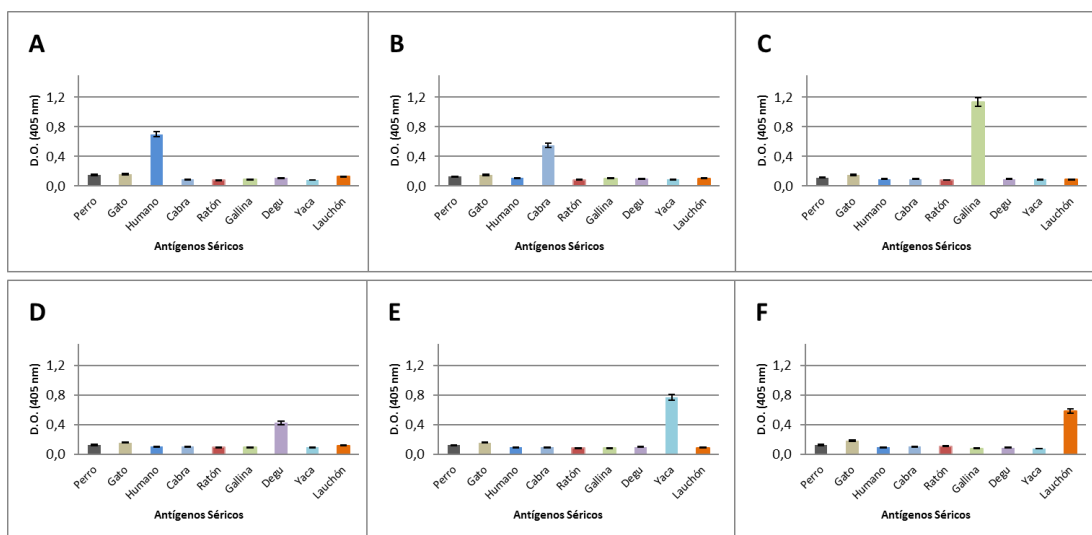


Figura 1. Estandarización mediante ELISA de una dilución específica de antisueros contra distintas especies animales. Placas de ELISA fueron sensibilizadas con sueros de distintos animales y enfrentadas a antisueros de conejo anti-humano (A), -cabra (B), -gallina (C), -degu (D), -yaca (E) y -lauchón (F), seguido de un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa. Un valor sobre 0,2 nm de densidad óptica (D.O.) se consideró una reacción positiva.

Tres antisueros, anti-perro, -gato y -ratón, no reconocieron de forma específica el suero homólogo (Figura 2), presentando reactividad cruzada contra gato (Figura 2A), perro (Figura 2B) y lauchón (Figura 2C), respectivamente.

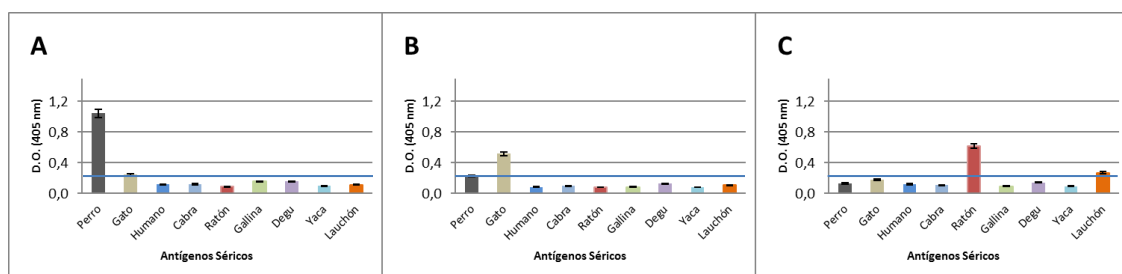


Figura 2. Estandarización mediante ELISA de una dilución específica de antisueros contra sueros de perro, gato y lauchón. Placas de ELISA fueron sensibilizadas con sueros de distintos animales y enfrentadas a antisueros de conejo anti-perro (A), -gato (B) y -ratón (C), en diluciones de 1:512.000, 1:200.000 y 1:50.000, respectivamente. Un valor sobre 0,2 nm de densidad óptica (D.O.) se consideró una reacción positiva.

Para mejorar la especificidad del antisuero de perro por su suero homólogo, se aumentó la dilución a 1:800.000, resultando ser específico (Figura 3A). En el caso de los sueros anti-gato y anti-ratón, para aumentar su especificidad, estos fueron inmuno-adsorbidos contra el suero con el cual presentaron reactividad cruzada (Figura 3B-C).

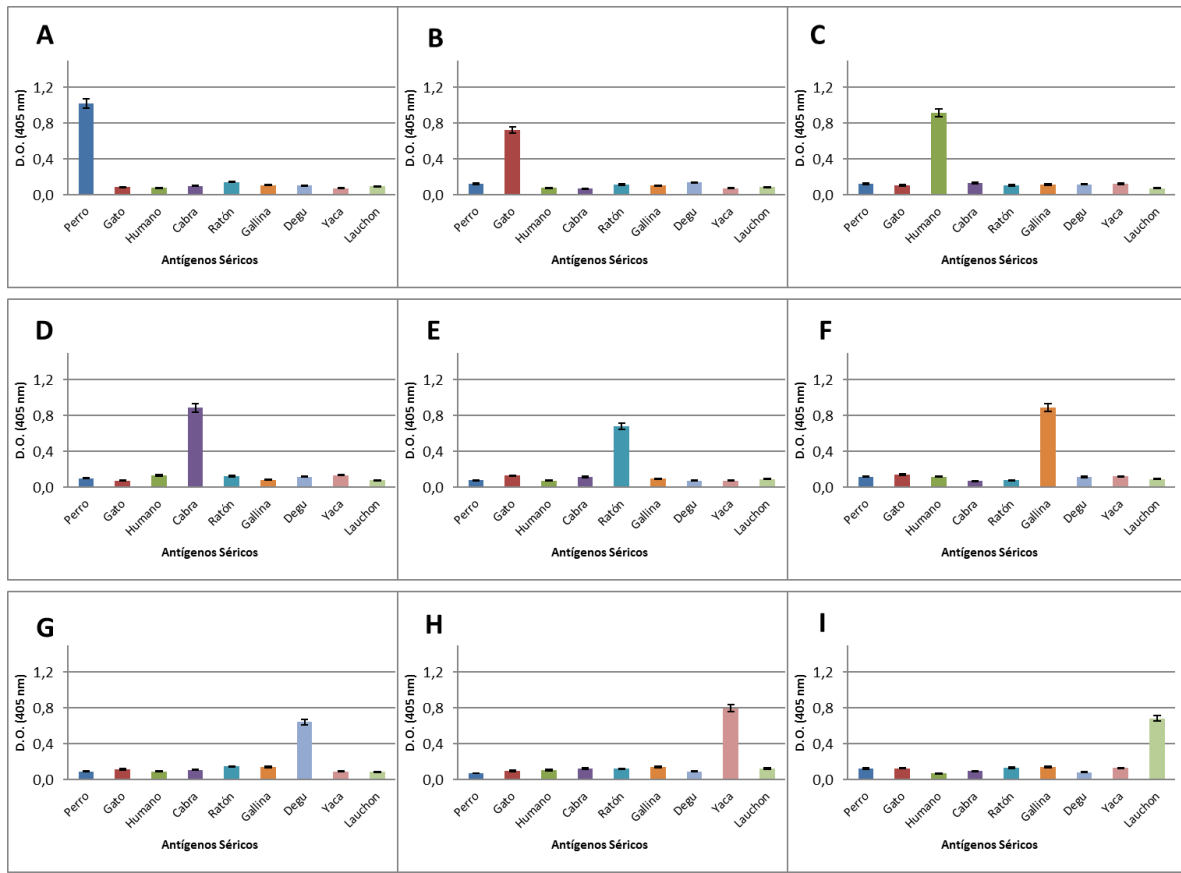


Figura 3. Especificidad de antisueros contra sueros homólogos mediante ELISA. Placas de ELISA fueron sensibilizadas con sueros de distintos animales y enfrentadas a antisueros de conejo anti-perro (A), -gato (B), -humano (C), -cabra (D), -ratón (E), -gallina (F), -degu (G), -yaca (H) y lauchón (I). Un valor sobre 0,2 nm de densidad óptica (D.O.) se consideró una reacción positiva.

Finalmente, la técnica propuesta es capaz de reconocer y discriminar específicamente antígenos séricos de distintos animales domésticos y silvestres. Las diluciones específicas de los antisueros son resumidas en la Tabla 1. Los antígenos séricos de conejo fueron detectados utilizando el anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa, contando con un panel total de 10 anti-sueros y anticuerpos (Tabla 1).

Tabla 1. Diluciones de antisuero capaces de reconocer antígenos séricos de distintas especies animales de manera específica.

Especie animal	Dilución específica del antisuero o anticuerpo
Perro	1:800.000
Gato	1:100.000
Humano	1:512.000
Cabra	1:64.000
Ratón	1:50.000
Gallina	1:56.000
Degu	1:40.000
Yaca	1:64.000
Lauchón orejudo	1:120.000
Conejo	1:2.000

5.2. Las deyecciones de triatomino presentan antígenos séricos de especies animales domésticas y silvestres en distintas frecuencias.

Del total de 173 muestras analizadas de deyecciones de triatomino, 38 (21,9%) fueron positivas al menos a una de las 10 especies testeadas como fuente de alimento. De estas, 3 (7,9%) tuvieron un resultado mixto, mostrando que estos triatomino se habían alimentado, por lo menos, de 2 hospederos (Anexo 5).

Las especies animales más consumidas corresponden a lauchón orejudo (34,1%), seguido por degu (22%) y conejo (17,1%) (Figura 4).

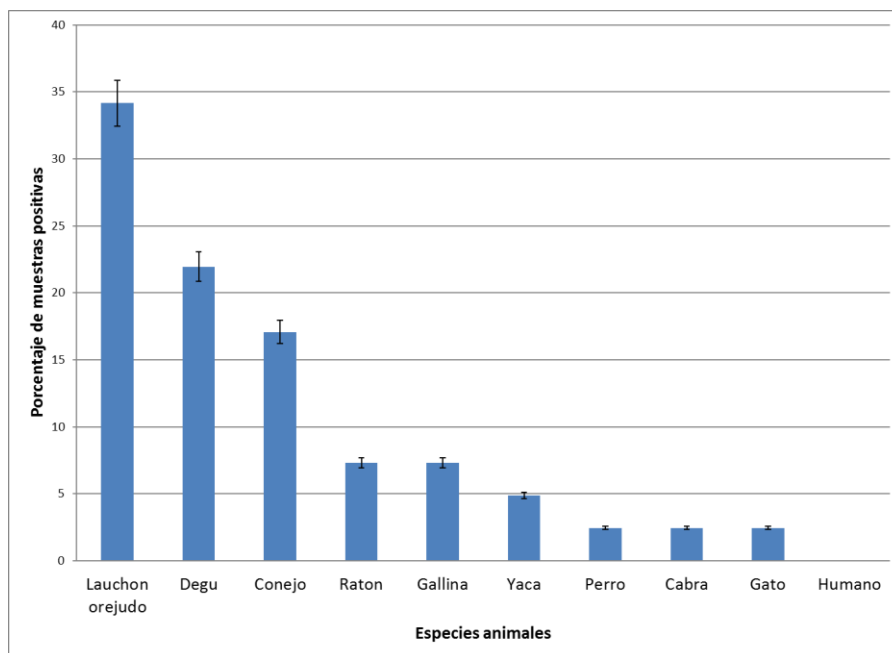


Figura 4. Perfil alimentario de insectos triatominos recolectados en la zona centro-norte de Chile. Porcentaje de resultados positivos obtenidos por especie animal.

En el total de triatominos analizados encontramos antígenos séricos de 9 de las especies animales consideradas como fuentes de alimento (Figura 5). Antígenos séricos de la especie humana no fueron detectados (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencias de deyecciones positivas por especie animal.

Especie animal	Reacciones positivas	
	n	%
Perro	1	2,44
Gato	1	2,44
Humano	0	0,00
Cabra	1	2,44
Ratón	3	7,32
Gallina	3	7,32
Degu	9	21,95
Yaca	2	4,88
Lauchón orejudo	14	34,15
Conejo	7	17,07
TOTAL	41	100,00

6. Discusión

El conocer el perfil alimentario de los insectos triatominos asociados al ciclo doméstico y silvestre de la enfermedad de Chagas es de gran importancia, ya que permite establecer relaciones entre los vectores de *T. cruzi* y sus potenciales hospederos. Este hecho, contribuye al estudio del ciclo de vida de este parásito, permitiendo generar estrategias preventivas y focalizar esfuerzos en el control de esta importante parasitosis.

Por lo anterior, es necesario realizar estudios utilizando técnicas altamente sensibles y específicas que permitan detectar un espectro amplio de orígenes alimentarios en vector de forma rápida y eficaz. Anteriormente, se han utilizado técnicas inmuno-enzimáticas para estudiar los hábitos de alimentación de mosquitos (Afonso *et al.*, 2012b; Burkot *et al.*, 1981; De Colmenares *et al.*, 1995; Marassá *et al.*, 2004) y triatominos (Curado *et al.*, 1997; Salvatella *et al.*, 1995; Schenone *et al.*, 1985).

Entre las principales técnicas utilizadas para identificar específicamente el tipo de alimentación de triatominos, se encuentran las técnicas inmunológicas de Precipitinas y ELISA. Este último presenta varias ventajas, ya que tiene mayor sensibilidad y especificidad, las cuales pueden ser mejoradas realizando variaciones en el valor de corte (*cut-off*), su lectura es objetiva, cuantificable y requiere sólo una pequeña cantidad de antisuero para detectar el antígeno de interés (Afonso *et al.*, 2012a).

En la presente Memoria de Título se estandarizó un método de ELISA altamente específico (Figura 1-3) en la detección de antígenos séricos de 10 especies animales tanto domésticas como silvestres, en las deyecciones de triatominos hematófagos. Este método fue estandarizado utilizando un panel de 9 antisueros de conejo generados en 2 Memorias de Título previas (Cruzat, 1997; Rengifo, 2000).

De las 173 muestras de deyecciones de triatominos analizados, en 38 (22%) se detectó alguna fuente de alimentación (Figura 4). El alto porcentaje de muestras negativas obtenidas es consistente con estudios anteriores (Canals *et al.*, 2001; Cruzat, 1997; Knierim *et al.*, 1976; Rengifo, 2000; Schenone *et al.*, 1985). Una posible causa podría ser la presencia de antígenos séricos de alguna especie animal no contemplada en este estudio (Canals *et al.*, 2001; Cruzat, 1997; Molina *et al.*, 2004; Rengifo, 2000) o una baja sensibilidad de la técnica estandarizada. En relación a esta última, es una causa poco probable, ya que, si consideramos que un suero normal posee aproximadamente 10 mg/mL

de IgG, nuestro ELISA es capaz de detectar aproximadamente 1 ng de IgG por pocillo (cantidad mínima de IgG contenida en una dilución 1/100.000). Las concentraciones de proteína medidas por Bradford en los contenidos intestinales de los triatominos, fluctuaron entre 0,4 y 2,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Estos contenidos fueron diluidos en PBS, alcanzando una concentración en el pocillo de 160 ng a 0,9 μg de proteína total por pocillo, concentración detectable por el método propuesto. Sin embargo, una tercera causa que explique el alto número de muestras negativas se podría deber a la capacidad de los insectos triatominos de tolerar largos periodos privados de alimento, siendo sometidos a periodos prologados de ayuno. Estos insectos digieren la sangre de sus hospederos en un periodo relativamente largo, que puede alcanzar los 14 días (Canals *et al.*, 1998; Schofield, 1994). Se ha descrito que muestras que superen los 30 días post picada, no mostrarían una reacción frente a ningún antisuero (Cruzat, 1997). Teniendo en cuenta lo anterior, la calidad o el tiempo entre la picada y la extracción del contenido intestinal, puede ser un factor a considerar en los resultados obtenidos. Las muestras utilizadas provenían de insectos silvestres, por tanto, el tiempo entre su última alimentación y la obtención de la muestra de deyección pudo ser bastante amplio; además, las muestras se conservaron congeladas por tiempo variable (semanas a meses), pudiendo afectar de forma negativa la calidad de muestras.

En relación a la especificidad del método de ELISA propuesto, este resultó ser altamente específico, excepto con 3 antisueros. Un caso particular de especificidad, lo constituye el suero anti-gallina, el cual, por su lejanía filogenética con el resto de las especies, presentó una señal colorimétrica mayor y altamente específica, por lo cual no fue necesario un ajuste de la dilución o recurrir a un proceso de inmunoadsorción. Los sueros anti-perro, -gato y ratón, presentaron reactividad cruzada contra antígenos séricos de gato, perro y lauchón orejudo, respectivamente. Es probable que esta cros-reactividad se deba a la cercanía filogenética entre las especies animales, la cual fue solucionada inmuno-adsorbiendo los antisueros contra la especie crosreactiva.

Los antígenos séricos fueron detectados en distintas frecuencias. Así, lauchón orejudo fue detectados en 14 oportunidades, degu en 9 y conejo en 7. Estas 3 especies animales pueden relacionarse al ciclo silvestre de la enfermedad de Chagas. Los antígenos séricos de ratón fueron detectados en 3 oportunidades. Las especies domiciliarias y peridomiciliarias como perro, gato, cabra y gallina fueron menos detectados, con 3 detecciones para gallina y sólo una detección para perro, gato y cabra. En ninguna de las deyecciones de triatominos se detectó la presencia de antígenos séricos humanos,

contrastando con los trabajos anteriores de Cruzat (1997) y Rengifo (Molina *et al.*, 2004; 2000).

El predominio de lauchón orejudo y degu, ya sea en forma única o en combinación con otra especie, podría ser explicado por un aumento en sus poblaciones o su mayor proporción en comparación con otros mamíferos en áreas endémicas. Además, se ha descrito que los triatominos se encontrarían más asociados a degu y lauchón orejudo que el resto de las especies analizadas (Jimenez *et al.*, 2015; Lent y Wygodzinsky, 1979). Estos micromamíferos, junto con los insectos, comparten los mismos hábitat, en entornos rocosos y en laderas (Jimenez y Lorca, 1990). La diferencia de detección entre ambos podría deberse a sus diferencias de desplazamiento. Se ha descrito que *O. degus* infectados con *T. cruzi* viajan distancias más cortas que los no infectados. Por el contrario, el lauchón orejudo aumenta su desplazamiento en individuos infectados (Jimenez *et al.*, 2015). Este hecho podría incidir en una mayor tasa de contacto entre el lauchón y el vector. Dado que ambas especies fueron las mayormente detectadas en este estudio, este resultado alcanza una mayor significancia, al considerar que previamente han sido descritas como las especies silvestres mayormente infectadas. Así, ambas especies podrían constituir un importante reservorio natural en el ciclo silvestre de transmisión de *T. cruzi* (Botto-Mahan *et al.*, 2012; Botto-Mahan *et al.*, 2010).

La presencia de antígenos séricos de conejo en la dieta de los triatominos evaluados es concordante con estudios previos (Canals *et al.*, 2001; Cruzat, 1997; Rengifo, 2000). Sin embargo, la proporción de detección encontrada fue mucho más baja, con un 17% frente al 77% obtenido por Rengifo (2000). Esta alta proporción obtenida puede ser debida a que ambas especies, conejo y *M. Spinolai*, comparten el mismo hábitat silvestre (Botto-Mahan *et al.*, 2009; Botto-Mahan *et al.*, 2005).

Por el contrario, la yaca, otro animal silvestre que comparte hábitat con estos insectos (Canals *et al.*, 2001; Palma, 1997), fue menos detectada en la dieta de los triatominos silvestres evaluados. Esto podría explicarse por su baja densidad de población en comparación con los roedores como lauchon orejudo y degu (Lima *et al.*, 2001; Lobos *et al.*, 2005). Por otro lado, la dieta de estos animales es insectívora (Palma, 1997), y es probable que sólo unos pocos de los vectores hayan escapado de su depredación. La presencia de *T. cruzi* ha sido descrita en poblaciones de yaca (Acuña, 2001; Botto-Mahan *et al.*, 2010; Botto-Mahan *et al.*, 2005). Este mamífero silvestre actúa como un controlador

natural del insecto, el cual podría infectarse a través del consumo de triatomíneos portando el parásito (Acuña, 2001; Rengifo, 2000).


Antígenos séricos de ratón se detectaron en 3 oportunidades (7,3%). Esta especie es sinantrópica, por lo cual puede representar un nexo entre el ciclo silvestre y doméstico de la enfermedad. Además, es una especie cercana a la vivienda humana, pero presente en hábitat silvestres (Lobos *et al.*, 2005). Las especies con menor frecuencia de detección fueron las domiciliarias y peridomiciliarias como perro, gato, cabra y gallina. Tres muestras fueron positivas para gallina (7,3%) y sólo una para perro (2,4%), gato (2,4%) y cabra (2,4%) (Tabla 1). Si bien las aves no son susceptibles a la infección (Kierszenbaum *et al.*, 1981), estas podrían ser una importante fuente de alimento. En relación a las especies mamíferas domésticas, tales como perros, gatos y pequeños rumiantes, algunos estudios las sugieren como especies centinelas de la infección chagásica (Gurtler *et al.*, 2007; Noireau *et al.*, 2009; Roque *et al.*, 2013). En este sentido, nuestro país posee la condición de libre de la transmisión vectorial a nivel de domicilio (Cattan *et al.*, 2002), por lo cual, es esperable que las especies domésticas y peridomésticas tengan bajos niveles de infección. Asimismo, la presencia de antígenos séricos humanos no fue detectada en este estudio. Este hecho contrasta con un estudio previo donde 4,62% de las muestras fueron positivas (Canals *et al.*, 2001). El resultado obtenido es esperable, ya que los ejemplares de *M. spinolai* fueron capturados en colinas pedregosas, grietas de rocas, nidos de aves y mamíferos y, sólo de vez en cuando, en las viviendas humanas (Canals *et al.*, 1998; Frias *et al.*, 1995; Lent y Wygodzinsky, 1979). La ausencia de antígenos séricos en *M. spinolai* podría ser un buen indicador del *estatus* de país libre de transmisión vectorial previamente señalado.

En síntesis, el conocimiento del perfil de alimentación de triatomíneos silvestres puede ayudarnos a entender sus posibles hábitats peridomésticos, su incursión en hábitats humanos (Salvatella *et al.*, 1995) y las relaciones entre vectores y hospedadores de *T. cruzi*. Estos datos son de gran importancia para generar estrategias preventivas y de control.

La presente Memoria de Título, proporciona datos sobre el perfil alimentario de vector *M. spinolai*, que está compuesto principalmente por especies silvestres, aun cuando fueron incluidas especies sinantrópicas. Algunas de ellas han sido identificadas como fuente alimenticia, indicando una probable intrusión de estos animales en el medio ambiente silvestre o de los triatomíneos en los hábitats domésticos. Sin embargo, estos resultados podrían cambiar, al involucrar otras especies domésticas, incluyendo los seres humanos o ampliando los sitios de muestreo hacia lugares más cercanos a las viviendas rurales.

7. Anexos

7.1. Certificado de Bioseguridad.

 Universidad de Chile
favet
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

CERTIFICADO N° 32


Santiago 04 noviembre de 2013

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, revisó el anteproyecto titulado: "Determinación del perfil alimentario de triatominos en las Regiones de Coquimbo, Valparaíso y Metropolitana", del Sr. Francisco Chacón O., cuyo Profesor Guía es la Dra. Galia Ramírez.


En el proyecto se estipulan las siguientes medidas de Bioseguridad:

- 1.- El Personal recibirá una inducción en normas de bioseguridad.
- 2.- Uso de vestimenta adecuada para realizar el trabajo en el laboratorio, delantal, uso de guantes y mascarilla, cubrepiés y pantalón largo.
- 3.- Uso de gabinetes de bioseguridad para manipulación de las muestras.
- 4.- Los desechos biológicos serán tratados con desinfectantes adecuados y autoclavados antes de ser eliminados.
- 5.- Material reutilizado será desinfectado y autoclavado.

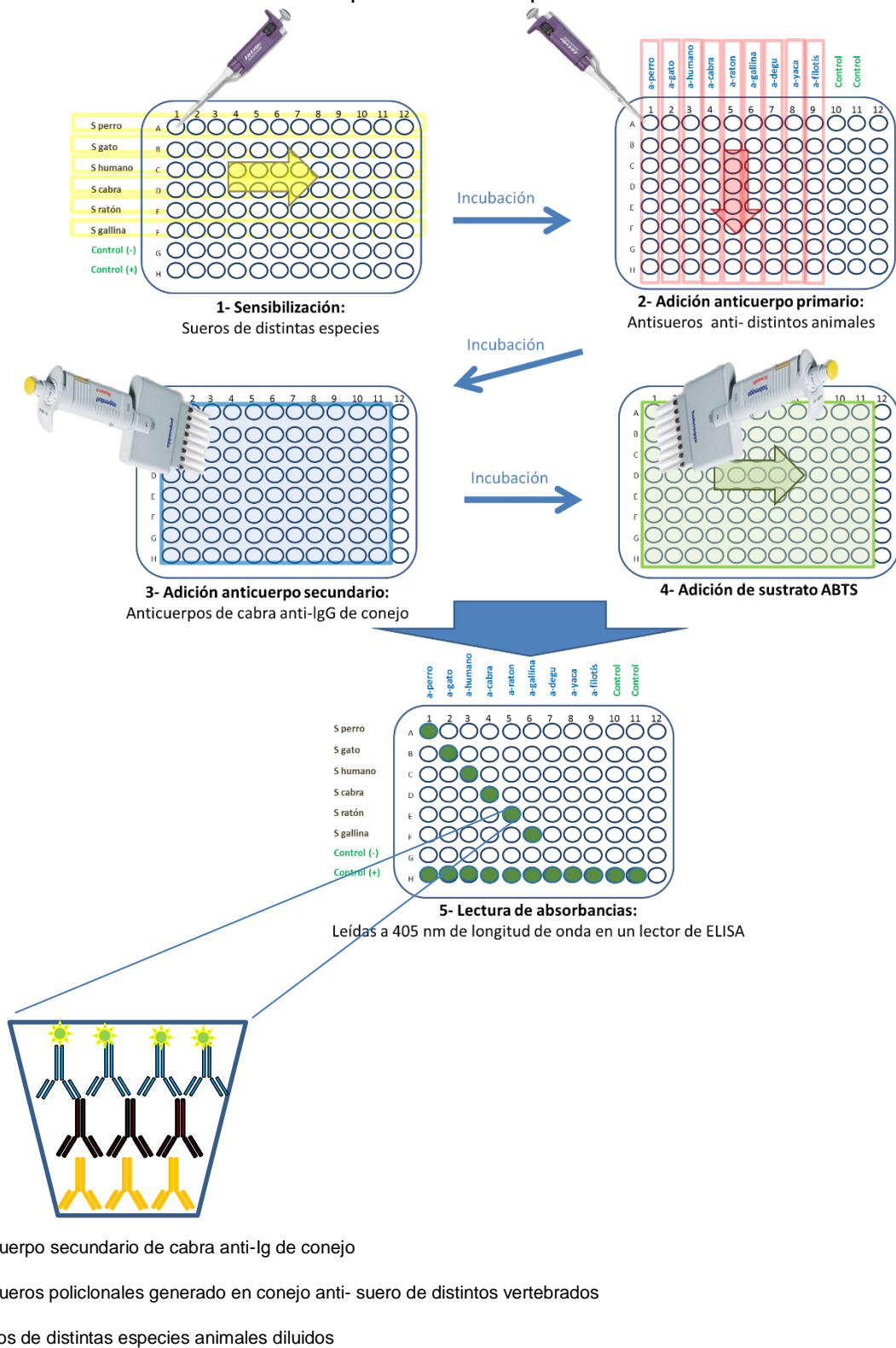
Con relación a lo expuesto, este comité estima que el proyecto se ajusta convenientemente con las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas de Bioseguridad" editado por CONICYT versión 2008 y previenen el riesgo para las personas, los animales y el medioambiente.


LISETTE LAPIERRE ACEVEDO

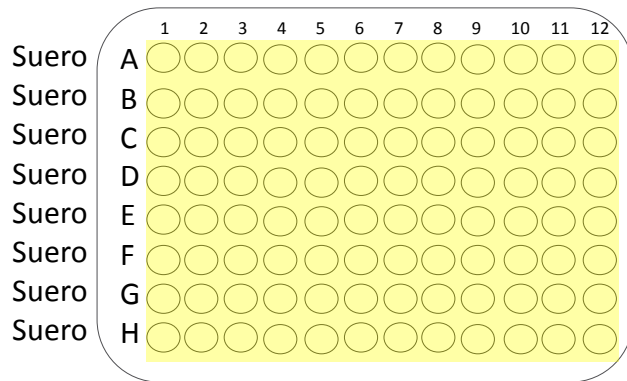
Coordinadora
Comité de Bioseguridad

 UNIVERSIDAD DE CHILE
COMITÉ
BIOSEGURIDAD
Fac. de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

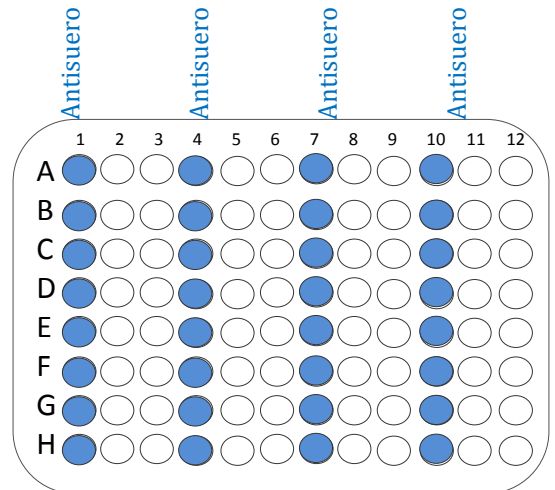
7.2. Modelo de sensibilización de una placa de ELISA para la estandarización del método.



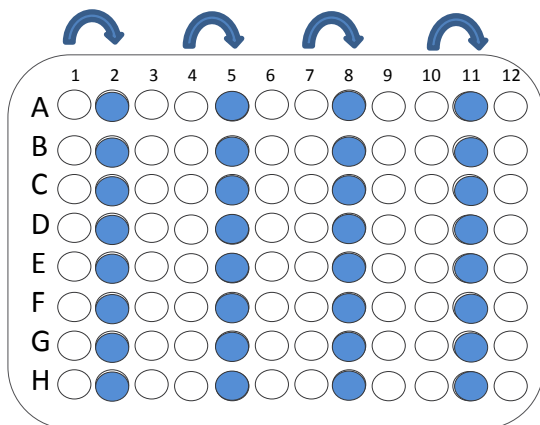
7.3. Purificación de antisueros por inmuno-adsorción.



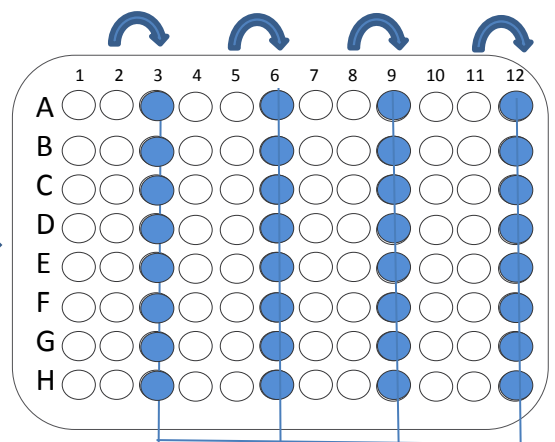
1- Sensibilización con suero problema



2- Adición antisero a purificar

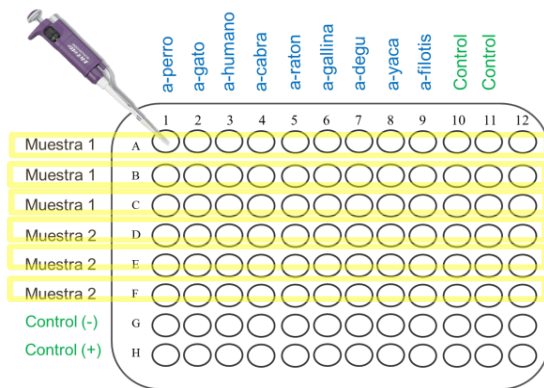


3- Desplazamientos de columnas de antisero

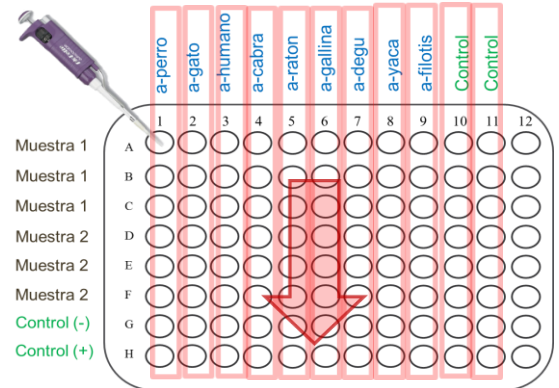


4- Sobrenadante, antisero purificado

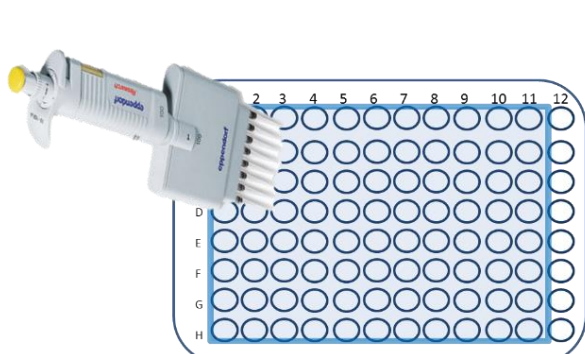
7.4. Modelo de identificación de antígenos séricos presentes en deyecciones de triatominos.



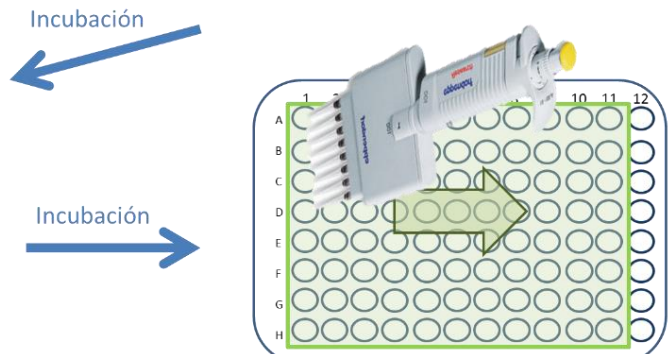
1- Sensibilización:
Deyección de triatominos



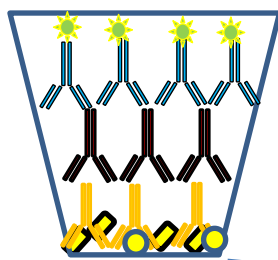
2- Adición anticuerpo primario:
Antisueros anti- distintos animales



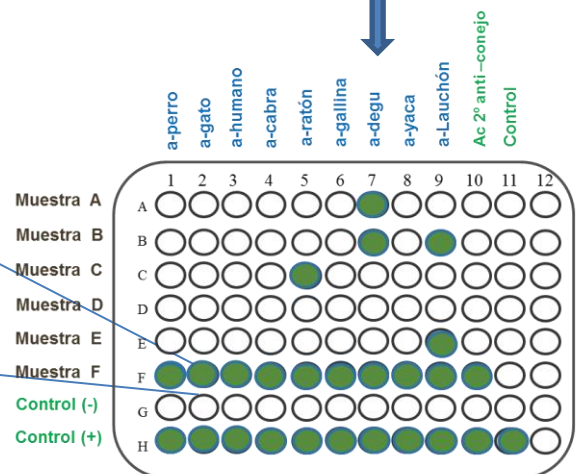
3- Adición anticuerpo secundario:
Anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo



4- Adición de sustrato ABTS



- Anticuerpo secundario de cabra anti-Ig de conejo
- Antisueros policlonales generados en conejo
anti- suero de distintos vertebrados
- Deyecciones de Triatominos



5- Lectura de absorbancias:
Leídas a 405 nm de longitud de onda en un lector de ELISA

7.5. Detalle de muestras positivas.

Nº	Muestra	Perro	Gato	Humano	Cabra	Ratón	Pollo	Degu	Yaca	Lauchón	Conejo	Positivos
5	3 d	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
11	7 c	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
12	8 a	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
15	10	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
17	14 a	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
18	15	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
23	26 e	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
24	28	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
43	67	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
62	92	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
68	104 b	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
71	109	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
85	06 K	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
89	10 K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
91	12 K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
94	15 K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
95	17 K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
97	19 K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
100	22 K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
104	C 020	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
105	C 028	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
106	C 101	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
107	C 102	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	2
112	C 177	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	2
114	C 234	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
118	C 336	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
120	CH 01	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
123	CH 04	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
128	CH 10	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
130	CH 17	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
131	CH 18	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
132	CH 20 a	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
136	TCH 007	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
139	TCH 011	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
144	TCH 021	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
152	TCH 044	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
163	TCH 283	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
170	TT 02	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	2
TOTAL		1	1	-	1	3	3	9	2	14	7	41

Detecciones positivas de AS de cada especie testeada como fuente de alimento, presentes en las deyecciones de triatominos. Se representa la identificación positiva en la prueba de ELISA con un número "1" y un "0" como la ausencia de detección. Se observan detecciones mixtas y un total de 41 reacciones positivas.

8. Referencias

- Acuña, M. 2001. Efecto del hospedero sobre el crecimiento poblacional de *Mepraia spinolai* (Hemiptera, Reduviidae). In Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile, Santiago, Chile. 68.
- Afonso, M., S. Chaves, and E. Rangel. 2012a. Evaluation of feeding habits of haematophagous insects, with emphasis on *Phlebotominae* (Diptera:Psychodidae), vectors of Leishmaniasis. *Trends in entomology* 8:125-136.
- Afonso, M.M., R. Duarte, J.C. Miranda, L. Caranha, and E.F. Rangel. 2012b. Studies on the feeding habits of *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations from endemic areas of American visceral Leishmaniasis in northeastern Brazil. *J Trop Med* 2012:858657.
- Apt, W., I. Heitmann, M.I. Jercic, L. Jofré, P. Muñoz. del V, I. Noemí, A.M. San Martín, J. Sapunar, M. Torres, and I. Zulantay. 2008. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte I. Introducción y epidemiología. *Rev Chil de Enfector* 25:189-193.
- Apt, W., and H. Reyes. 1990. Algunos aspectos de la Enfermedad de Chagas en Latinoamérica. *Parasitol Día* 14:23-40.
- Arenas, M., R. Campos, X. Coronado, S. Ortiz, and A. Solari. 2012. *Trypanosoma cruzi* genotypes of insect vectors and patients with Chagas of Chile studied by means of cytochrome b gene sequencing, minicircle hybridization, and nuclear gene polymorphisms. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12:196-205.
- Botto-Mahan, C., M. Acuna-Retamar, R. Campos, P.E. Cattán, and A. Solari. 2009. European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) are naturally infected with different *Trypanosoma cruzi* genotypes. *Am J Trop Med Hyg* 80:944-946.
- Botto-Mahan, C., A. Bacigalupo, J.P. Correa, E. Oda, and A. Solari. 2012. Field assessment of *Trypanosoma cruzi* infection and host survival in the native rodent *Octodon degus*. *Acta Trop* 122:164-167.
- Botto-Mahan, C., R. Campos, M. Acuna-Retamar, X. Coronado, P.E. Cattán, and A. Solari. 2010. Temporal variation of *Trypanosoma cruzi* infection in native mammals in Chile. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10:317-319.
- Botto-Mahan, C., P.E. Cattán, M. Canals, and M. Acuna. 2005. Seasonal variation in the home range and host availability of the blood-sucking insect *Mepraia Spinolai* in wild environment. *Acta Trop* 95:160-163.
- Burkot, T.R., W.G. Goodman, and G.R. DeFoliart. 1981. Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 30:1336-1341.
- Canals, M., R.O. Bustamante, M.H. Ehrenfeld, and P.E. Cattán. 1998. Assessing the impact of disease vectors on animal populations. *Acta Biotheor* 46:337-345.
- Canals, M., P. Cattán, and M. Ehrenfeld. 1994. Sobrevivencia de *Triatoma spinolai* en ambiente habitacional. *Parasitol Día* 18:82-87.
- Canals, M., L. Cruzat, M.C. Molina, A. Ferreira, and P.E. Cattán. 2001. Blood host sources of *Mepraia spinolai* (Heteroptera: Reduviidae), wild vector of Chagas Disease in Chile. *J Med Entomol* 38:303-307.

- Cruzat, M.L. 1997. Perfil alimentario de *Triatoma spinolai* en el peridomicilio de una zona de riesgo epidemiológico perteneciente a la Región Metropolitana. In Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile, Santiago, Chile. 55.
- Curado, I., A. Duarte, A.A. Lal, S.G. Oliveira, and J.K. Kloetzel. 1997. Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae P-brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92:235-243.
- De Colmenares, M., M. Portus, J. Botet, C. Dobano, M. Gallego, M. Wolff, and G. Seguí. 1995. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *J Med Entomol* 32:229-233.
- Frias, D., A. Solari, C. Gonzáles, A. Henry, and A. Alviña. 1995. Índices de infección de *Mepraia spinolai* con *Trypanosoma cruzi*, su invasión a ambientes domésticos e interacción con *Triatoma infestans*. *Parasitol Día* 19:195.
- Gurtler, R.E., M.C. Cecere, M.A. Lauricella, M.V. Cardinal, U. Kitron, and J.E. Cohen. 2007. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 134:69-82.
- Jimenez, C., F.E. Fonturbel, E. Oda, P.A. Ramirez, and C. Botto-Mahan. 2015. Parasitic infection alters rodent movement in a semiarid ecosystem. *Mammal Biol* 80:255-259.
- Jimenez, J., and M. Lorca. 1990. American Trypanosomiasis in wild vertebrates and its relation to the vector *Triatoma-spinolai*. *Arch Med Vet* 22:179-183.
- Kierszenbaum, F., C.A. Gottlieb, and D.B. Budzko. 1981. Antibody-independent, natural resistance of birds to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Parasitol* 67:656-660.
- Knierim, F., M. Castro, F. Villarroel, and H. Schenone. 1976. Preliminary studies on *Triatoma infestans* and *Triatoma spinolai* source of feeding by the use of gel double diffusion test (author's transl). *Bol Chil Parasitol* 31:34-36.
- Lent, H., and P.W. Wygodzinsky. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163:130-138.
- Lima, M., N.C. Stenseth, N.G. Yoccoz, and F.M. Jaksic. 2001. Demography and population dynamics of the mouse opossum (*Thylamys elegans*) in semi-arid Chile: seasonality, feedback structure and climate. *Proc Biol Sci* 268:2053-2064.
- Lobos, G., M. Ferres, and R. Palma. 2005. Presencia de los géneros invasores *Mus* y *Rattus* en áreas naturales de Chile: un riesgo ambiental y epidemiológico. *Rev Chil Hist Nat* 78:113-124.
- Lorca, M., A. García, M.I. Bahamonde, A. Fritz, and R. Tassara. 2001. Certificación serológica de la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Chile. *Rev med Chile* 129:264-269.
- Maekelt, G. 1983. La epidemiología de la enfermedad de Chagas en relación con el ecosistema domiciliario. *Interciencia* 8:353-360.
- Marassá, A.M., C.A. Consales, and E.A.B. Galati. 2004. Padronização da técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina para a

- identificação de sangue ingerido por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Rev Soc Bras Med Trop* 37:441-446.
- Molina, M.C., P. Cattan, M. Canals, L. Cruzat, J.C. Aguillon, and A. Ferreira. 2004. A simple immunometric assay to assess the feeding habits of *Meprai spinolai*, a *Trypanosoma cruzi* vector. *Parasitol Res* 92:375-379.
- Noireau, F., B. Bastrenta, S. Catala, J.P. Dujardin, F. Panzera, M. Torres, R. Perez, C. Galvao, and J. Jurberg. 2000. Sylvatic population of *Triatoma infestans* from the Bolivian Chaco: from field collection to characterization. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95 Suppl 1:119-122.
- Noireau, F., P. Diosque, and A.M. Jansen. 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res* 40:
- Palma, R. 1997. *Thylamys elegans*. *Mamm Species* 1-4.
- Rengifo, A. 2000. Preferencias alimentarias específicas de *Mepraia spinolai* por vertebrados frecuentes en su hábitat. In Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile, Santiago, Chile. 69
- Roque, A.L.R., S.C.C. Xavier, M. Gerhardt, M.F.O. Silva, V.S. Lima, P.S. D'Andrea, and A.M. Jansen. 2013. *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. *Veterinary Parasitology* 193:71-77.
- Salvatella, R., R. Rosa, Y. Basmadjian, A. Puime, L. Calegari, J. Guerrero, M. Martinez, G. Mendaro, D. Briano, C. Montero, and et al. 1995. Ecology of *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Triatominae) in wild and peridomestic environments of Uruguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90:325-328.
- Schenone, H., H. Christensen, A.M. Vásquez, C. González, E. Méndez, A. Rojas, and F. Villarroel. 1985. Fuentes de alimentación de triatomas domésticos y su implicancia epidemiológica en relación a Enfermedad de Chagas en áreas rurales de siete regiones de Chile. *Bol Chil Parasitol* 40:34-38.
- Schenone, H., F. Villarroel, A. Rojas, and E. Alfaro. 1980. Factores biológicos y ecológicos en la epidemiología de la Enfermedad de Chagas en Chile. *Bol Chil Parasitol* 35:42-45.
- Schofield, C. 2000. *Trypanosoma cruzi* $\frac{3}{4}$ the vector-parasite paradox. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:535-544.
- Schofield, C.J. 1994. Triatominae: biology & control. Eurocommunica Publications, 80 pp.
- Toso, A., F. Vial, and N. Galanti. 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Med Chil* 139:258-266.
- WHO. 2000. Chagas disease interrupted in Chile. *TDR News* 61:1-159.
- WHO. 2015. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). *Organización Mundial de la Salud*