



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

RELACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA DE *Trypanosoma cruzi* CON EL ESTADO DE DESARROLLO, PESO ABDOMINAL Y TAMAÑO DEL VECTOR SILVESTRE *Mepraia spinolai*

MARÍA VICTORIA BARRERA GALLEGUILLOS

Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias
Mención Medicina Preventiva Animal

Santiago-Chile

2017



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

RELACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA DE *Trypanosoma cruzi* CON EL ESTADO DE DESARROLLO, PESO ABDOMINAL Y TAMAÑO DEL VECTOR SILVESTRE *Mepraia Spinolai*

MARÍA VICTORIA BARRERA GALLEGUILLOS

Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias
Mención Medicina Preventiva Animal

DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO CATTAN A.

Santiago-Chile

2017



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

SE INFORMA A LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO Y POSTÍTULO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS, QUE LA TESIS DE MAGÍSTER PRESENTADA POR LA CANDIDATA

MARÍA VICTORIA BARRERA GALLEGUILLOS

HA SIDO APROBADA POR LA COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS CON MENCIÓN EN MEDICINA PREVENTIVA ANIMAL, EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DÍA 14 DE JULIO DE 2017

DIRECTOR DE TESIS

DR. PEDRO CATTAN A.

COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE DE TESIS

DRA. GALIA RAMÍREZ T .

DR. RIGOBERTO SOLÍS M.

Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio de Ecología del Departamento de Ciencias Biológicas Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile contó con financiamiento

FONDECYT 1140650

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

TESIS DE MAGÍSTER

**RELACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA DE *Trypanosoma cruzi*
CON EL ESTADO DE DESARROLLO, PESO ABDOMINAL Y TAMAÑO DEL VECTOR
SILVESTRE *Mepraia spinolai***

Alumno:

María Victoria Barrera Galleguillos

Pasaje Alcalá # 315, Quilicura

Móvil: 96378981

Profesor Guía:

Pedro E. Cattán Ayala

Departamento de Ciencias Biológicas Animales

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

Universidad de Chile

562-9785629

Financiamiento:

Proyecto FONDECYT 1140650

SANTIAGO – CHILE

2017

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (ECh) o tripanosomiasis americana es una zoonosis parasitaria causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (Kollien y Schaub, 2000) , transmitido por alrededor de 150 especies de triatomos hematófagos, con más de 100 especies de mamíferos reservorios (Coura, 2013). La parasitosis se encuentra distribuida desde el sur de Estados Unidos hasta la zona centro-sur de Argentina y Chile (Coura, 2013), y debido a sus implicancias médicas, sociales y económicas, constituye uno de los principales problemas de salud pública en Latinoamérica (Guhl, 2007; Hotez et al., 2012). Se calcula que en el mundo hay entre 6 a 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi*, la mayoría de ellas en América Latina (WHO, 2015).

En el año 1991, se inician actividades de la Comisión Intergubernamental del Cono Sur (INCOSUR), para interrumpir la transmisión vectorial y transfusional del parásito. En Chile se realizaron campañas para el control del vector doméstico de la enfermedad de Chagas, situación que permitió establecer para el año 2000 la posibilidad de alcanzar la meta de la interrupción de la transmisión vectorial de la infección por *T. cruzi* a través de este mecanismo. Sin embargo, el país no está libre de su presencia, lo cual obliga a mantener la vigilancia entomológica (Lorca et al., 2001; ISP, 2015).

En Chile se describen cuatro especies de vectores de la enfermedad de Chagas: el vector doméstico, *Triatoma infestans* (Klug, 1834), y tres vectores silvestres, *Mepraia spinolai* (Porter, 1934), *Mepraia gajardoi* (Frias et al., 1998) y *Mepraia parapatrica* (Frías-Lasserre, 2010). En la medida que se elimina el vector doméstico, cobran cada día más importancia los estudios en los vectores silvestres, sobre todo en áreas donde existe contacto con el hombre (Frías et al., 1995).

Mepraia spinolai actúa como vector del ciclo silvestre de la enfermedad de Chagas, y a la inversa de *T. infestans*, que es mucho más antropofílica en sus preferencias hematófagas, *M. spinolai* exhibe una marcada zoofilia (Apt y Reyes, 1986). Sin embargo, se ha encontrado a este triatomino cerca de viviendas humanas, donde se alimenta de animales del ámbito peridomiciliario y también de sangre humana. Debido a esto, se le puede considerar como potencialmente peligrosa, especialmente en zonas donde existe contacto habitual con el hombre (Ortiz et al., 2015).

Algunas de las principales características del ciclo de vida de *T. cruzi* fueron descritas hace más de un siglo, sin embargo el desarrollo del parásito dentro de sus vectores sigue estando mal caracterizado (Dias et al., 2015). Por ejemplo, No está claro si en todos los estados de *M. spinolai* la carga parasitaria es similar.

El nivel de infección promedio de algunas poblaciones es alto y varía entre 38,3 y 54,1% de los especímenes (Frias et al., 1998; Botto-Mahan et al., 2005a). Dado que las poblaciones están constituidas mayoritariamente por ninfas es de importancia determinar si las cargas parasitarias de *T. cruzi* en cada estadio son diferentes, pues esto permitiría diferenciar el potencial de transmisión

de cada uno. Es factible proponer entonces, que, si la proporción de infectados varía en los diferentes estados de desarrollo, la carga parasitaria también varíe.

Existen distintos métodos para la detección de *T. cruzi*. En la última década, la técnica molecular más usada ha sido la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) (Campos *et al.*, 2007b) . Ensayos moleculares basados en una técnica cuantitativa como el PCR en tiempo real (qPCR) permite un análisis más sensible que técnicas parasitológicas convencionales, debido a que es capaz de amplificar específicamente la secuencia satelital del ADN del parásito (Cummings y Tarleton, 2003; Piron *et al.*, 2007).

Con estos antecedentes, se propone el presente trabajo con el propósito de dilucidar la presentación diferencial de la carga de *T. cruzi* en los diferentes estados de desarrollo de *M. spinolai*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas (ECh), descrita en 1909 por Carlos Chagas, es causada por el protozoo flagelado *T. cruzi*. Este parásito se transmite principalmente mediante vectores hematófagos triatomíneos. La ECh se considera una de las mayores preocupaciones en materia de salud pública en América Latina (Texeira et al., 2006). Se encuentra en el continente americano desde hace más de 9.000 años, extendiéndose desde el sur de Estados Unidos de Norteamérica hasta el sur de Argentina y Chile. Se estima que 6 a 7 millones de personas se encuentran infectadas en el mundo (WHO, 2015) y que 75 a 90 millones están expuestas a contraer la infección (Coura, 2007).

En Chile, la ECh en su transmisión vectorial se extiende desde la región de Arica y Parinacota a la región del Libertador General Bernardo O'Higgins, siendo más frecuente en áreas rurales y periurbanas (Apt et al., 2008). En la actualidad, 850.000 personas viven en zonas endémicas de riesgo para contraer la enfermedad y se estima que en el país hay aproximadamente 142.000 personas infectadas con *T. cruzi*. El 56% de los casos de ECh corresponde al Servicio de Salud de Coquimbo, zona endémica de la enfermedad (Apt et al., 2008).

Los principales hematófagos involucrados en la transmisión de *T. cruzi* en Chile son el vector doméstico *T. infestans* y especies silvestres del género *Mepraia*, conocidos comúnmente como vinchucas.

El año 1991, los Ministros de Salud de seis países del Cono Sur, incluido Chile, se comprometieron a realizar acciones para lograr interrumpir la transmisión vectorial y transfusional de la enfermedad de Chagas. Todas las acciones realizadas dieron sus frutos y desde 1999 en el país se encuentra certificada la interrupción de la transmisión por medio de la transmisión vectorial, pero no libre de su presencia, lo cual obliga a mantener la vigilancia entomológica (ISP, 2015). Con respecto a la transmisión transfusional, durante el año 2009 se consolida la implementación del tamizaje obligatorio para descartar *T. cruzi* en donantes de sangre en todo el territorio nacional (OPS, 2010). Actualmente en Chile, esta parasitosis es adquirida principalmente mediante la transmisión transplacentaria (Lorca et al., 2001), pudiendo además ser transmitido por, trasplante de órganos, oral, accidentes de laboratorio y por leche materna (Rassi Jr et al., 2010).

Esta enfermedad constituye un problema grave en la salud pública, debido a que las personas infectadas desarrollan lesiones cardíacas crónicas y digestivas irreversibles (Schofield, 1994). Entre el 20-25% de los casos humanos presenta sintomatología. En la fase aguda de la enfermedad, la menos común en Chile, hay proliferación del parásito en distintas células, caracterizándose también por una alta parasitemia, aumento del volumen de los nódulos linfáticos, esplenomegalia, hepatomegalia, meningoencefalitis y cardiomegalia por la dilatación de las cavidades del corazón. Esta fase aguda se observa en Chile sólo en niños con infección congénita (Atias y Apt, 1991). En

la fase crónica, el compromiso orgánico se centra principalmente en miocardio y tubo digestivo. En estos casos se pueden desarrollar cardiomegalias por la dilatación e hipertrofia del miocardio, en tanto en el tubo digestivo, principalmente el esófago y el colon aparecen elongados y muy dilatados, con importante hipertrofia de su 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).

Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un protozoo de la Clase Flagelata, Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae. Éste posee una gran mitocondria (kinetoplasto) que contiene ADN organizado en una red encadenada de maxicírculos y minicírculos (De Souza, 2000).

Este parásito muestra una alta diversidad genética, que se clasifica en seis unidades discretas de tipificación (DTUs), designadas como TcI - TcVI (Zingales et al., 2009). Estos DTUs se distribuyen de manera diferente en las regiones endémicas y en los ciclos de transmisión (Miles et al., 2009; Zingales et al., 2012). Los genotipos encontrados frecuentemente en Chile son TcI, TcII, TcV y TcVI (Solari et al., 2001).

Aproximadamente el 10% del genoma de *T. cruzi* está formado por un ADN satélite ubicado en el núcleo del protozoo, con alrededor de 10^5 copias en el genoma del parásito. Como blanco para la amplificación, el ADN satelital es altamente conservado y por lo tanto puede proporcionar mediciones precisas para qPCR (Elias et al., 2003; Elias et al., 2005). Se ha descrito una variabilidad en el número de copias de esta región dependiendo de la DTU, describiendo a TcII, TcV y TcVI con el mayor número de copias, a TcIII con una cantidad de copias dos veces menor que los anteriores y a TcI y TcIV con una cantidad de copias diez veces menor que TcII, TcV y TcVI (Duffy et al., 2009; lenne et al., 2010).

Vectores

Los vectores de *T. cruzi* pertenecen al Orden Hemiptera, Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae. Los triatominos son hematófagos estrictos y hemimetábolos típicos, pasando desde el huevo y cinco estados ninfales hasta llegar a machos y hembras adultos (Frias et al., 1998).

En el mundo existen más de un centenar de especies de triatominos y la mayoría son vectores del parásito *T. cruzi*. Se han descrito cuatro especies en nuestro país: *T. infestans*, Klug, 1834, insecto de mayor importancia epidemiológica, ya que es el principal vector de *T. cruzi*, obtiene su alimento principalmente del hombre y de animales en ambientes domésticos y coloniza el interior y el peridomicilio de las viviendas humanas; *M. spinolai* Porter 1934, también vector del parásito, corresponde a la primera especie silvestre endémica de triatomo descrita para Chile. Actualmente habita en áreas silvestres y periurbanas (Bacigalupo et al., 2012); su distribución abarca desde la

Región de Atacama hasta la Región de O'Higgins (26° a 33° S) (Frias-Lasserre, 2010). Por lo general se le puede encontrar en zonas áridas y semiáridas de los valles de interior, asociándose generalmente a canteras, grietas en rocas, nidos de aves, madrigueras de mamíferos silvestres, bromeliáceas y pircas (Canals *et al.*, 2001; Bacigalupo *et al.*, 2006; Bacigalupo *et al.*, 2010).; *M. gajardo* (Frias *et al.*, 1998), corresponde a la segunda especie del género descrita en Chile, presente en el desierto costero del norte del país (18° a 26°) sólo en hábitats silvestres (Sagua Franco *et al.*, 2000; Canals *et al.*, 2001; Carvajal *et al.*, 2007; Botto-Mahan *et al.*, 2008); y *M. parapatrica* (Frias-Lasserre, 2010), es la especie de más reciente descripción del género en Chile. Se encuentra distribuida en la zona costera de las regiones de Antofagasta y Atacama, en el área comprendida entre el límite norte de distribución de *M. spinolai* y el límite sur de distribución de *M. gajardo* correspondiente al desierto litoral entre los 24° 36' – 26° 51'S (Campos *et al.*, 2013).

Ciclo biológico

Trypanosoma cruzi 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 triatomínicos; es la forma infectante para mamíferos y triatomínicos, pero no se multiplica;
- 2.- Epimastigote: de aspecto ovalado con un flagelo en el extremo anterior; se encuentra en el intestino medio de los triatomínicos 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).

Los triatomínicos se infectan al ingerir sangre de mamíferos infectados con tripomastigotes, los cuales pasan al lumen del intestino medio donde se multiplica como epimastigotes. Después de 15 a 30 días los epimastigotes migran a la pared del intestino posterior, para transformarse en tripomastigotes metacíclicos. Posteriormente, el triatomino al picar emite heces con tripomastigotes metacíclicos 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 hasta destruir la célula liberando los parásitos a circulación y penetrando en otras células. El ciclo se completa cuando triatomínicos no infectados ingieren sangre de mamíferos infectados con tripomastigotes (Schofield, 1994; Atias, 1998).

Características de *Mepraia spinolai*

Mepraia spinolai se distribuye entre los paralelos 26° y 34° S desde los valles y las zonas costeras y el interior hasta los 3000 m de altura (Frias *et al.*, 1998). Ha sido encontrada entre piedras, en grietas de rocas, en sitios de descanso de diferentes mamíferos como zorros, conejos, liebres, vizcachas y otros roedores, y marsupiales. En el peridomicilio, se ha encontrado en corrales de animales

domésticos (Lent y Wygodzinsky, 1979), y también existen algunos antecedentes que indican a esta especie como colonizadora de viviendas rurales (Schenone et al., 1995). Desde el punto de vista de la alimentación, se considera a esta especie como un depredador oportunista que se alimenta principalmente del hospedero más abundante o del que esté presente, incluyendo al ser humano (Molina et al., 2004; Ortiz et al., 2015). Los primeros cálculos del índice tripano-triatomino en *M. spinolai* se realizaron por observación microscópica (Apt y Reyes, 1990; Ordenes et al., 1996), técnica específica pero poco sensible al compararla con técnicas moleculares como la PCR.

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 se deben a *M. spinolai*; por otra parte, el promedio de infección por *T. cruzi* en este vector alcanzaba el 11,4%, llegando al 25,8% en la Región de Coquimbo (Ordenes et al., 1996; Canals et al., 1998). Sin embargo, usando herramientas diagnósticas más sensibles como PCR, se alcanzan cifras de hasta un 58,1% de infección por *T. cruzi* en *M. spinolai* (Coronado et al., 2009).

Trypanosoma cruzi en Triatoma infestans y Mepraia spinolai

Con respecto de la eficiencia vectorial, estudios han demostrado que *T. infestans* tiene una mayor eficiencia vectorial que *M. spinolai*. Esto último se infiere por el hecho que *M. spinolai* tiene un mayor lapso de tiempo entre la alimentación y la defecación en comparación con *T. infestans*, situación que disminuye la probabilidad de transmitir a *T. cruzi* (Canals et al., 1999). Sin embargo, recientes estudios revelan que cohortes de *M. spinolai* positivas a *T. cruzi* cambian sus patrones de comportamiento, disminuyendo el tiempo entre alimentación y defecación, con lo cual se aumenta la transmisibilidad del parásito (Botto-Mahan et al., 2006). Otros estudios realizados en regiones endémicas de Brasil en relación a la susceptibilidad que tienen diferentes triatominos a la infección con *T. cruzi*, revelaron que *T. infestans* tiene una baja eficiencia vectorial en comparación con otras especies (Alejandre et al., 1993; De Carvalho y Perlowagora-Szumlewicz, 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 Pinto et al., 2000)

Al comparar los resultados del xenodiagnóstico en roedores, el vector *M. spinolai* detecta más positivos que *T. infestans*, por lo que se sugiere 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 genotipos de *T. cruzi* y a su vez capaz de combinarlos en un mismo insecto (Campos et al., 2007a; Campos et al., 2007b)

Estos estudios revelan la importancia que pueden desempeñar los vectores silvestres en la transmisión de la enfermedad de Chagas, infiriendo que *M. spinolai* ha tenido un mayor tiempo para coevolucionar con *T. cruzi* en el ciclo silvestre en Chile respecto de *T. infestans* (Briones et al., 1999;

Campos *et al.*, 2007a) .De esta forma, el vector silvestre *M. spinolai* podría propagar mayor cantidad y más eficientemente los diversos genotipos de *T. cruzi* en Chile (Campos, 2012).

Detección del parásito en el vector

Para detectar el parásito en los vectores se han usado diferentes técnicas, desde la observación directa del parásito en las heces del vector hasta técnicas moleculares.

Tradicionalmente, *T. cruzi* se ha detectado en los insectos vectores por examen microscópico directo del contenido intestinal o disección y análisis de todo el insecto (Moser *et al.*, 1989; Pizarro, 1996). Estos ensayos de microscopía convencionales ofrecen un diagnóstico fiable con un costo relativamente bajo; sin embargo, está condicionado a realizarse con el insecto vivo, ya que una vez muerto, es casi imposible detectar el parásito en las heces del insecto (Dorn *et al.*, 1999). Por otra parte, la detección del parásito en los estados de desarrollo pequeños muchas veces es ignorada debido a la dificultad en la manipulación de estos estados ninfales. Por último, la detección del parásito es subjetiva, ya que varía entre los observadores (Pizarro *et al.*, 2007).

La técnica de PCR, es utilizada para amplificar segmentos del ADN kinetoplastídico de *T. cruzi* a partir de muestras de sangre de animales y humanos y contenido intestinal de triatomíneos. Ha demostrado ser sensible y exitosa (Zulantay *et al.*, 2004; Botto-Mahan *et al.*, 2005b; Rozas *et al.*, 2005)

Con respecto a la técnica molecular de qPCR, permite un análisis cuantitativo más sensible que las técnicas parasitológicas convencionales (Piron *et al.*, 2007). Esta técnica utiliza marcadores fluorescentes para la monitorización continua de la amplificación de toda la reacción. Sus múltiples ventajas son la rápida obtención de los resultados (amplificación y detección en un solo paso) y un menor riesgo de contaminación por manipulación de las muestras. La qPCR se puede utilizar tanto como un ensayo cualitativo (presencia/ausencia) como cuantitativo (Piron *et al.*, 2007).

Problemática de los vectores silvestres

Las campañas de saneamiento en contra de *T. infestans* han disminuido la población de este insecto vector (Lorca *et al.*, 2001). Surge entonces el problema de los vectores silvestres y el papel que pueden desempeñar éstos en la epidemiología de la enfermedad de Chagas. Se puede inferir que los vectores silvestres podrían eventualmente colonizar el ambiente doméstico al eliminar localmente a *T. infestans* (Campos *et al.*, 2013), situación que ya ha ocurrido en otras zonas endémicas de América con *Triatoma sordida*, Stål 1859 y *Triatoma guasayana*, Wygodzinsky y Abalos 1949 (Gorla *et al.*, 1993). En Chile, se han descubierto focos silvestres de *T. infestans* asociados a bromeliáceas (*Puya* sp.) en áreas de Calera de Tango y Talagante, Región Metropolitana (Bacigalupo *et al.*, 2006), y otros donde se presenta en simpatria con *M. spinolai* asociados a pircas en Putaendo, Región de Valparaíso (Bacigalupo *et al.*, 2010).

En la región de Coquimbo existen poblaciones de *M. spinolai* más abundantes, y su ubicación no se restringe a las áreas silvestres, pudiendo estar muy cercanas a viviendas en zonas rurales, lo que hace latente el riesgo de transmisión de *T. cruzi* por este vector, alcanzando niveles de infección de hasta 76,1% en poblaciones de este triatomino en el centro-norte de Chile, en zonas donde la transmisión por *T. infestans* se encuentra interrumpida (Sandoval-Rodríguez *et al.*, 2015).

Estado de desarrollo de *M. spinolai* y su relación con la infección

Bajo condiciones de laboratorio, se ha descrito que el ciclo de vida de *M. spinolai* dura entre 299 y 492 días. Específicamente, los huevos demoran 30-40 días en eclosionar, el estado ninfal I dura 15-57 días, el II 19-23 días, el III 21-52 días, el IV 27-58 días y el V 187-262 días (Canals *et al.*, 1994; Lent *et al.*, 1994). Por lo general, 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). Esto debiera afectar los niveles de ingreso del parásito en los diferentes estados del vector. Dado que se espera que las ninfas tengan diferentes conductas de alimentación.

Distintos estudios han demostrados que existen rangos de infección en los estados de desarrollo de *M. spinolai*. Utilizando la técnica de PCR convencional, un estudio en la Reserva Nacional las Chinchillas reportó un 46,2% de ninfas infectadas con *T. cruzi*, y un rango entre 38,3 y 54,1% de infección en los diferentes estados (Botto-Mahan *et al.*, 2005b). Otro estudio realizado en Til-Til, Región Metropolitana, detectó un rango de infección de 37,0 y 71,4% (Bacigalupo *et al.*, 2006). Córdova (2010), detectó niveles de infección de hasta un 44,5% en la localidad de Colina, Región Metropolitana, con un rango de infección de 22,2 y 66,7%.

Con respecto al comportamiento de *T. cruzi* en los estados de desarrollo de *M. spinolai*, un estudio utilizando un diseño experimental de infección dirigida y seguimiento de cohortes detectó que *T. cruzi* modifica algunos rasgos de historia de vida de *M. spinolai*. Los vectores infectados requieren más tiempo para alcanzar la adultez que vectores no infectados, por lo tanto también se detectó que los vectores infectados son menos pesados que los no infectados (Botto-Mahan, 2009). Se ha propuesto que, parásito y triatomino compiten por elementos trazas presentes en la sangre ingerida por *M. spinolai*, necesarios para gatillar la inducción hormonal del proceso de muda (Schaub, 1992; Kollien y Schaub, 2000). Una consecuencia de esta demora en el tiempo de desarrollo es que *T. cruzi* podría aumentar su probabilidad de transmisión a hospederos vertebrados definitivos, debido a que insectos infectados requerirían alimentarse un mayor número de veces para alcanzar la madurez (Schaub, 1994) y consecuentemente transmitir el parásito vía heces contaminadas.

Por otra parte, estudios de laboratorio han demostrado que existe transmisión directa de *T. cruzi* entre vectores de Chagas, mediante canibalismo, donde un individuo de un estadio pica el abdomen

de otro de mayor tamaño que se haya alimentado de una presa, y también mediante la coprofagia, en el cual un triatomino se alimenta de las deyecciones frescas de otro vector (Schaub, 1988b). Esto debiera redundar en cargas diferenciales de parásito en los diferentes estados.

Gracias a la técnica molecular de qPCR que permite cuantificar la carga parasitaria, es posible hoy día, establecer la cantidad de parásitos presentes en los vectores silvestres. Dada la importancia que puede adquirir *M. spinolai* en Chile, como vector alternativo de la enfermedad de Chagas, se buscará dilucidar si hay cargas parasitarias diferenciales entre sus distintos estados de desarrollo, lo que permitirá definir mejor la importancia epidemiológica de las ninfas y adultos en la transmisión de *T. cruzi*. Este estudio se ha planteado para la región de Coquimbo, donde la ECh ha sido siempre de mayor importancia por ser considerada una región hiperendémica (Schenone et al., 1995). Hay que destacar que, hasta el momento, no se ha considerado esta variable (carga parasitaria) en los estudios realizados. Por ello, estos resultados aportarán un elemento nuevo en el estudio de la epidemiología de esta enfermedad.

HIPÓTESIS

- 1- Dado que los distintos estados de desarrollo de *M. spinolai* muestran conductas alimentarias diferentes frente a sus hospederos, esto se expresará en cargas parasitarias diferenciales de *T. cruzi*, entre tales estados.
- 2- Dado que los vectores infectados tienen menor peso que los no infectados (Botto-Mahan, 2009), la carga parasitaria se expresará en un diferencial de peso y tamaño de los infectados, esperando que, a mayor carga parasitaria, menor peso y tamaño del vector.

OBJETIVO GENERAL

Relacionar la carga parasitaria de *T. cruzi* con el estado de desarrollo, la variación del peso abdominal y tamaño, en el vector silvestre *Mepraia spinolai*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer si existen variaciones de la carga parasitaria entre los diferentes estados de desarrollo de *M. spinolai*.
2. Evaluar la relación del peso abdominal y tamaño corporal de *M. spinolai* con la carga parasitaria por *T. cruzi* en los distintos estados de desarrollo.
3. Evaluar si existen variaciones de la carga parasitaria por *T. cruzi*, entre las localidades estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODO

Insectos en estudio

Se dispuso de 1.471 triatominos capturados mediante trampas de levadura en fermentación en 7 localidades rurales de la IV Región de Coquimbo durante diciembre del 2014, enero y febrero del año 2015. Las localidades fueron Gualliguaica (comuna de Vicuña) y Cochiguaz (comuna de Paihuano) de la provincia de Elqui; Tulahuén (comuna de Monte Patria), Rinconada de Punitaqui (comuna de Punitaqui) y Valle Hermoso (comuna de Combarbalá) de la provincia de Limarí; Matancilla (comuna de Illapel) y Tranquilla (comuna de Salamanca) de la provincia de Choapa.

Todos los ejemplares murieron por inanición, por lo cual la alimentación no fue factor que influyese en el peso, estadio de desarrollo y carga parasitaria.

Determinación de la Especie y Estado de Desarrollo

Para la determinación de la especie y estado de desarrollo se utilizaron diferentes características morfológicas basadas en lo descrito por Lent y Wygodzinsky (1979) y Frías (Frias et al.).

Tamaño Total

La medición del largo total fue desde el borde anterior del clipeo hasta el extremo posterior del último urotergito; se colocó cada triatominos sobre papel milimetrado y se observó en una lupa estereoscópica Olympus ZS30.

Peso Abdominal

Se separó del abdomen de los insectos en estudio por medio de bisturí y pinzas entomológicas. El pesaje del abdomen se realizó en una balanza analítica con una precisión de 0,0001 gr.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir del total del abdomen de cada insecto, previa maceración mecánica con baquetas de vidrio, a través de un kit comercial (*Mo Bio, UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit*) según recomendaciones del fabricante. El ADN extraído se conservó a -20°C hasta su uso.

Cuantificación de ADN total extraído mediante fluorimetría

Se realizó una cuantificación del ADN total extraído a través de fluorimetría, ocupando el kit *dsDNA HS Assay* en el fluorímetro Qubit®3.0 y registrando los resultados en ng/μL, para estandarizar las muestras a analizar y evidenciar la calidad del ADN de la muestra.

Cuantificación de ADN satelital de *T. cruzi* mediante PCR tiempo real

La cuantificación de *T. cruzi* se realizó por duplicado a través de la amplificación de una región conservada satelital mediante qPCR. La mezcla de reacción fue: 2 µL de la muestra (2 ng de ADN total), 4 µL de Mix HOT FIREPol® EvaGreen® 5X, 0,6 µL de cada uno de los oligonucleótidos Cruzi 1 (5'-ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3') y Cruzi 2 (5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3') y 12,8 µL de agua libre de nucleasas para un volumen final de reacción de 20 µL. Para la cuantificación del ADN de *M. spinolai* se realizó por duplicado a través de la amplificación de una región conservada del ADN ribosomal (subunidad 18S). La mezcla de reacción fue la misma descrita anteriormente usando los oligonucleótidos 18S For (5'-TCCTTCGTGCTAGGAATTGG-3') y 18S Rev (5'-GTACAAAGGGCAGGGACGTA-3') y 12,8 µL de agua libre de nucleasas para un volumen final de reacción de 20 µL. Se trabajó en campana de flujo laminar para evitar contaminaciones y se evitó la luz directa sobre los reactivos durante el procedimiento. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Rotor-Gene® Q (2plex HRM Platform). El programa de amplificación ocupado consta de una incubación a 95°C por 15 min, continuando con 40 ciclos consistentes en: una etapa de desnaturalización a 95°C por 15 seg.; una etapa de hibridación a 65°C por 20 seg.; y una etapa de extensión a 72°C por 20 seg. El registro de la fluorescencia emitida se realizó a 72°C al final de cada ciclo. En todos los ensayos se incluyeron: un control sin templado (CST), en el cual se reemplazó la muestra por agua libre de nucleasas; un control positivo (punto de la curva de cuantificación con ADN de *T. cruzi*); y un control negativo de la reacción (extraído de ADN de *M. spinolai* de laboratorio libre de infección).

La curva estándar para la cuantificación absoluta de *T. cruzi* se realizó a partir de ADN genómico de *T. cruzi* cepa DM28c (TcI) y cepa Y (TcII), debido a la variabilidad en la cantidad de copias de la región satelital de *T. cruzi* según su DTU (Duffy et al., 2009; Moreira et al., 2013). Los cálculos se estimaron considerando el ADN equivalente a 1.000.000 parásitos/mL (1 parásito contiene 200 fg o 0,0002 ng de ADN) , realizando diluciones seriadas 1:10.

Para la normalización de datos se ocupó parásitos-equivalentes/ ng de ADN de triatomino, de esta manera la intensidad de la parasitosis se pueda comparar para todos los estados de desarrollo.

Análisis Estadístico

Objetivo específico 1

La carga parasitaria de los diferentes estados de desarrollo se analizó por medio de una prueba de Kruskal-Wallis y para evaluar que estados son diferentes se realizó la prueba a posteriori de Dunn.

Objetivo específico 2

Se realizó un análisis de correlación no paramétrica para el peso abdominal y tamaño total en relación con la carga parasitaria.

Objetivo específico 3

Las cargas parasitarias de las diferentes localidades se analizaron por medio de la prueba Kruskal-Wallis y para evaluar qué localidades eran diferentes se realizó la prueba a posteriori de Dunn.

RESULTADOS

Determinación de la Especie y Estado de Desarrollo

Todos los insectos capturados pertenecieron a la especie *M. spinolai*. Del total, 60 correspondieron a adultos (4%), 40 al estado de desarrollo V (3%), 73 al estado de desarrollo IV (5%), 360 al estado de desarrollo III (24%), 361 al estado de desarrollo II (25%) y 577 al estado de desarrollo I (39%).

Tamaño de especímenes

El largo total varió entre un mínimo de 0,3 cm para las ninfas I hasta 2,6 cm en adultos. Los datos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Tamaño de *M. spinolai* en los diferentes estados de desarrollo expresado en centímetros.

	Adulto	Ninfa V	Ninfa IV	Ninfa III	Ninfa II	Ninfa I
Tamaño Mín.	1,5	1,5	1,2	0,6	0,5	0,3
Tamaño Máx.	2,6	1,7	1,5	1,3	1,5	0,6
Promedio	1,9	1,5	1,4	1,1	0,8	0,4
Desv. Estándar	0,25	0,005	0,06	0,13	0,11	0,05

Peso Abdominal

El resultado del peso abdominal de los 1.471 insectos capturados por estado de desarrollo se resume en la Tabla 2.

Tabla 2. Pesos de abdómenes de *M. spinolai* en los diferentes estados de desarrollo expresado en miligramos.

	Adulto	Ninfa V	Ninfa IV	Ninfa III	Ninfa II	Ninfa I
Peso Mín.	3	2,9	3	1	0,1	0,1
Peso Máx.	40	28,7	25,1	16	8,6	1,6
Promedio	12,53	12,16	10,23	4,71	1,83	0,25
Desv. Estándar	6,92	5,80	4,46	2,34	1,26	0,21

Cuantificación de ADN total extraído mediante fluorimetría

Todas las muestras extraídas presentaron una cantidad de ADN adecuada para la amplificación a través de qPCR. Las muestras fueron llevadas a una concentración de 5 ng/ul para evitar inhibiciones por exceso de ADN.

Detección de *T. cruzi*

Del total de 1.471 triatomíneos analizados, 1387 (94,3%) fueron positivos y 84 (5,7%) resultaron negativos a la presencia de *T. cruzi*, siendo todos los adultos positivos (Tabla 3). Se encontraron diferencias significativas para la infección entre los diferentes estados de desarrollo (chi-cuadrado = 12,02; p = 0,0345). El estado adulto y las ninfas III fueron diferentes con respecto a las ninfas I (prueba exacta de Fisher p < 0,05).

Tabla 3. Detección de *T. cruzi* en *M. spinolai* según estado de desarrollo.

	Adulto	Ninfa V	Ninfa IV	Ninfa III	Ninfa II	Ninfa I	Total
Infectados	60 (100%)	37 (92,5%)	68 (93,2%)	347 (96,4%)	343 (95%)	532 (92,2%)	1387
No infectados	0	3	5	13	18	45	84
Total	60	40	73	360	361	577	1471

Al analizar los resultados de acuerdo a la presencia de *T. cruzi* en *M. spinolai* en las siete localidades del estudio, no se encontraron diferencias significativas (chi-cuadrado = 8,062; p = 0,2336) (Tabla 4).

Tabla 4. Detección de *T. cruzi* en *M. spinolai* según localidad.

	Cochiguaz	Tranquilla	Tulahuén	Matancilla	Valle Hermoso	Guelliguaica	Rinconada	Total
Infectados	34	556	56	385	122	31	203	1387
No infectados	1	42	3	27	4	1	6	84
Total	35	598	59	412	126	32	209	1471

Cuantificación de la carga parasitaria de *T. cruzi*

Las cargas parasitarias de las muestras positivas presentaron una mediana de 0,26 par-eq/ μ g de triatomino, observándose una diferenciación en dos grupos bien definidos: uno con una gran carga parasitaria (>100 par-eq/ μ g de triatomino) y otro con una menor carga parasitaria (<10 par-eq/ μ g de triatomino) (Fig. 1).

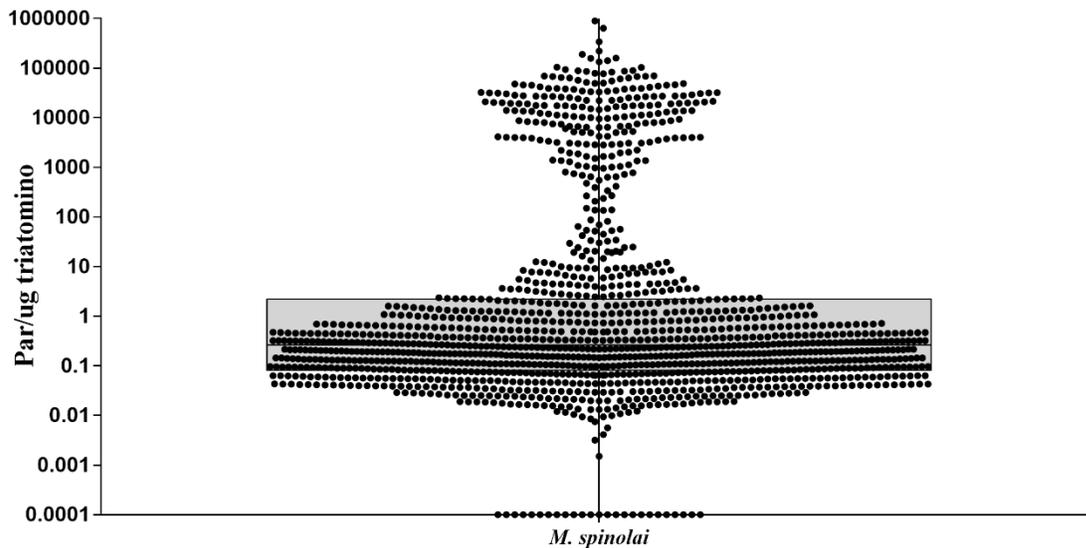


Figura 1. Carga parasitaria de *T. cruzi* en *M. spinolai*. La línea interior de la caja representa la mediana y la caja se extiende desde el mayor al menor cuartil. Las líneas exteriores indican la mayor y menor carga y cada punto representa una observación. En el eje X se representan todas las capturas de *M. spinolai* y el eje Y representa la carga parasitaria de *T. cruzi* en parásitos-equivalentes por microgramo de triatomino.

Objetivo específico 1: Establecer si existen variaciones de la carga parasitaria entre los diferentes estados de desarrollo de *M. spinolai*.

Para establecer si existieron variaciones de la carga parasitaria entre los diferentes estados de desarrollo se llevó a cabo una prueba de Kruskal-Wallis. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,0001$) para la carga entre los diferentes estados de desarrollo. Los resultados de la prueba a posteriori de Dunn (comparaciones múltiples), evidenciaron que las Ninfas III tenían diferencias significativas respecto al resto de los estadios, excepto las Ninfas V (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de P según prueba de comparaciones múltiples de Dunn entre estados de desarrollo de *M. spinolai*, según su carga de *T. cruzi*. En celeste se observan las diferencias estadísticamente significativas.

Estados de Desarrollo	Adulto	Ninfa V	Ninfa IV	Ninfa III	Ninfa II
Adulto	-	-	-	-	-
Ninfa V	0,2843	-	-	-	-
Ninfa IV	>0,9999	>0,9999	-	-	-
Ninfa III	<0,0001	>0,9999	0,0102	-	-
Ninfa II	0,2139	>0,9999	>0,9999	0,0001	-
Ninfa I	0,3893	>0,9999	>0,9999	<0,0001	>0,9999

Al analizar la carga parasitaria en cada uno de los estados de desarrollo, se observó que la mediana más baja se detectó en el estadio III (0,1094 par-eq/ μ g) y la mayor al estadio adulto (2,182 par-eq/ μ g) (Fig. 2)

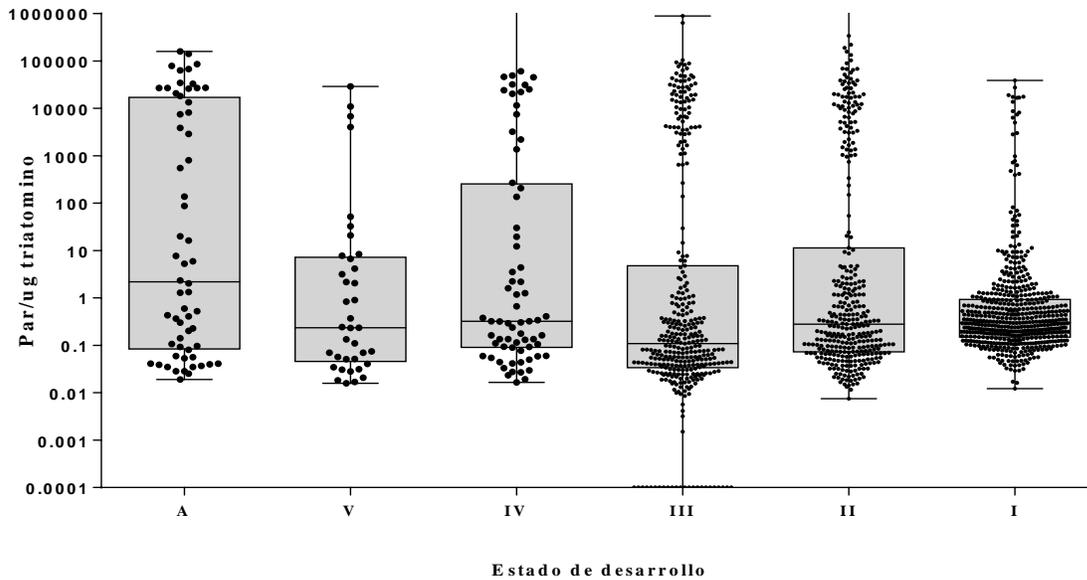


Figura 2. Carga parasitaria de *T. cruzi* según estado de desarrollo de *M. spinolai*. La línea interior de la caja representa la mediana y la caja se extiende desde el mayor al menor cuartil. Las líneas exteriores indican la mayor y menor carga y cada punto representa una observación. En el eje X se representa cada estado de desarrollo y el eje Y representa la carga parasitaria de *T. cruzi* en parásitos-equivalentes por microgramo de triatomino.

Posteriormente, se evaluó si existían diferencias entre las cargas parasitarias de los diferentes estados de desarrollo en cada localidad, encontrándose diferencias en cuatro de ellas (Tabla 6).

Tabla 6. Diferencias en la carga parasitaria de *T. cruzi* por estado de desarrollo en cada localidad.

Localidad	Valor Prueba	Valor P	Significancia
Cochiguaz	F: 0,43	0,83	N.S.
Tranquilla	KW: 18,3	0,0029	Si
Tulahuén	F: 10,28	< 0,001	Si
Matancilla	KW: 45,61	<0,001	Si
Valle Hermoso	KW: 17,59	0,0035	Si
Gualliguaica	KW: 1,92	0,75	N.S.
Rinconada	KW: 4,72	0,45	N.S.

Al analizar la cantidad de triatomíneos evaluados por tramos de carga parasitaria según estado de desarrollo, se observa que las diferencias del estado de desarrollo III se presentan en el grupo de muestras menores a 10 par-eq/ μ g (Kruskal-Wallis, valor de $p < 0.0001$) (Tabla 7).

Tabla 7. Carga parasitaria de *T. cruzi* en *M. spinolai* según estado de desarrollo.

Par-eq/ μ g vinchuca	Adulto	Ninfa V	Ninfa IV	Ninfa III	Ninfa II	Ninfa I	Total
0	0	3	5	13	18	45	84
<0,1	0	15	19	173	112	74	393
0,1- 1	27	8	20	73	105	330	563
1- 10	7	7	7	20	39	88	168
10- 100	3	3	3	2	6	18	35
100- 1.000	3	0	3	5	5	7	23
1.000- 10.000	4	2	4	29	30	7	76
10.000- 100.000	14	2	11	42	39	8	116
>100.000	2	0	1	3	7	0	13
Total	60	40	73	360	361	577	1471

Objetivo específico 2: Evaluar la relación del peso abdominal y tamaño corporal de *M. spinolai* con la carga parasitaria de *T. cruzi* en los distintos estados de desarrollo.

Para establecer si existió una relación entre el peso abdominal y tamaño corporal de *M. spinolai* con la carga parasitaria de *T. cruzi* se realizaron correlaciones de Spearman en cada uno de los estados de desarrollo para las variables peso abdominal y tamaño total respecto a la carga parasitaria, encontrando correlación solo para las Ninfas II con respecto al peso y tamaño (valor $p < 0,0001$), sin embargo, el r para estas correlaciones fue muy cercano a 0 (r peso: $-0,1626$, r tamaño: $-0,1114$) (Tabla 8).

Tabla 8. Valores de P según correlación de Spearman entre peso abdominal y tamaño total respecto a la carga parasitaria en cada estado de desarrollo de *M. spinolai*.

	Carga Parasitaria						
	Adulto	Ninfa V	Ninfa IV	Ninfa III	Ninfa II	Valor r	Ninfa I
Peso abdominal	0,8494	0,9556	0,0983	0,4546	0,0025	-0,163	0,9971
Tamaño total	0,6072	0,2803	0,7412	0,5093	0,0392	-0,111	0,5432

Objetivo específico 3: Evaluar si existen variaciones de la carga parasitaria por *T. cruzi*, entre las localidades estudiadas

Para establecer si existieron variaciones de la carga parasitaria entre las diferentes localidades, se llevó a cabo una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,0001$) para la carga entre las diferentes localidades. Los resultados de la prueba a posteriori de Dunn, para evaluar entre que localidades existían estas diferencias en la carga parasitaria, evidenció que Cochiguaz y Matancilla presentaron diferencias significativas con la mayoría de las otras localidades (Tabla 9).

Tabla 9. Valores de P según prueba de comparaciones múltiples de Dunn entre localidades, según carga por *T. cruzi*. En celeste se observan las diferencias estadísticamente significativas.

Localidades	Guelliguaica	Cochiguaz	Tulahuén	Valle Hermoso	Rinconada de P.	Matancilla
Guelliguaica	-	-	-	-	-	-
Cochiguaz	0,3355	-	-	-	-	-
Tulahuén	0,8913	<0,0001	-	-	-	-
Valle Hermoso	0,0107	<0,0001	>0,9999	-	-	-
Rinconada de P.	0,5052	<0,0001	>0,9999	0,4459	-	-
Matancilla	>0,9999	>0,9999	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-
Tranquilla	>0,9999	0,0002	>0,9999	<0,0001	0,0631	<0,0001

Al analizar la carga parasitaria en cada una de las localidades, se observó que la mediana más baja se detectó en Cochiguaz (0,04463 par-eq/ μ g) y la mayor en Valle Hermoso (1,556 par-eq/ μ g)

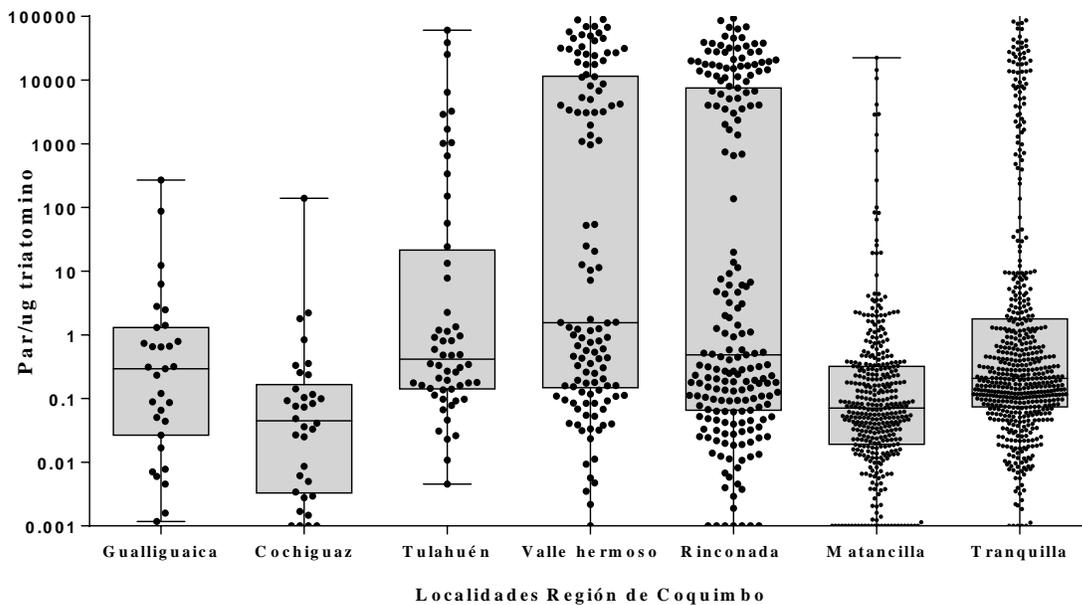


Figura 3. Carga parasitaria de *T. cruzi* en *M. spinolai* según localidades de la región de Coquimbo. La línea interior de la caja representa la mediana y la caja se extiende desde el mayor al menor cuartil. Las líneas exteriores indican la mayor y menor carga y cada punto representa una observación. En el eje X se representa cada localidad de la región de Coquimbo y el eje Y representa la carga parasitaria de *T. cruzi* en parásitos-equivalentes por microgramo de triatomo.

DISCUSIÓN

Los insectos triatominos son un amplificador natural del parásito protozoo *T. cruzi* (Kollien y Schaub, 2000). Por esto, la evaluación de la carga parasitaria en estos vectores y su relación con la biología de sus vectores es de gran importancia para conocer la forma de dispersión de *T. cruzi*, parásito de gran implicancia en la salud pública (Hotez *et al.*, 2012). Por otra parte, el ciclo silvestre posee una gran relevancia en la enfermedad de Chagas, manteniendo a Chile como un país endémico (Bacigalupo *et al.*, 2006). Debido a lo mencionado anteriormente, en este estudio se ha evaluado la carga parasitaria de *T. cruzi* en vectores silvestres *M. spinolai* capturados en zonas rurales de la región de Coquimbo y relacionado con sus diferentes estados de desarrollo, peso abdominal y tamaño total.

Como era de esperarse, y de acuerdo a lo descrito por Schofield y col (1998) y Cattán y col (2002), las capturas obtenidas durante la época de verano fueron en su gran mayoría ninfas I, disminuyendo la cantidad de ejemplares de cada estado de desarrollo hasta el estado adulto. Al evaluar la presencia de *T. cruzi* en estos triatominos se detectó un 94,3% de infección, porcentaje considerablemente mayor a lo previamente descrito por otros autores en Chile. Órdenes y col (1996) detectaron un 26,02% en la región Metropolitana con la técnica de microscopía directa (Órdenes *et al.*, 1996). Sin embargo, posteriormente utilizando PCR convencional en esta misma región, se detectó una infección del 40,9% (Bacigalupo *et al.*, 2006). En la región de Coquimbo, particularmente en la reserva Nacional las Chinchillas, los porcentajes de infección han variado entre un 46,2% y un 76,1% a través de PCR convencional (Botto-Mahan *et al.*, 2005b; Coronado *et al.*, 2009). Es posible que el alto nivel de sensibilidad del PCR tiempo real, la evaluación de la cantidad y calidad de ADN total previa amplificación y el uso de un control endógeno para descartar la presencia de inhibidores del PCR en la muestra, hayan permitido la detección de un mayor porcentaje de muestras positivas. El PCR tiempo real permite evidenciar la amplificación de una región específica de ADN en cualquier ciclo de amplificación, mejorando la sensibilidad en la detección de patógenos (Piron *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha descrito que el ADN satelital, junto con el ADN kinetoplastídico del minicírculo, representan las secuencias más abundantes en *T. cruzi* (Requena *et al.*, 1996; Duffy *et al.*, 2009; Ramirez *et al.*, 2015), y los métodos de PCR basados en estas secuencias estuvieron entre los más sensibles en el contexto de un estudio de PCR comparativo internacional (Schijman *et al.*, 2011).

Al comparar la presencia de *T. cruzi* con los diferentes estados de desarrollo de *M. spinolai*, se detectaron diferencias de las ninfas I respecto el estado adulto y las ninfas III, encontrándose en las ninfas I el mayor número de negativos ($n = 45$). Esto puede explicarse debido a que los estados de mayor desarrollo han estado más tiempo expuestos para adquirir los parásitos (Schaub, 1988a). Sin embargo, Botto-Mahan y col (2005) describieron niveles de infección similares entre los estados de desarrollo, desde 38,3 a 54,1%, indicando que las ninfas más jóvenes podrían ser tan importantes

como los mayores estados en la transmisión del parásito. En este estudio, los niveles de infección variaron entre un 92,2 a 100%, confirmando la importancia de las ninfas I en esta transmisión.

Al estudiar la carga parasitaria de *T. cruzi* en la totalidad de triatomíneos capturados se observó una sobre-dispersión (varianza mayor a la media) de los datos, característica en poblaciones de macro-parásitos (Poulin, 2007). Se destacaron dos agrupaciones: una con cargas sobre los 100 parásitos equivalentes/ μg de ADN triatomíneo y otra bajo los 10 parásitos equivalentes/ μg de ADN triatomíneo. Este comportamiento podría ser debido a las diferentes Unidades Discretas de Tipificación (DTUs) existentes en esta población. Se ha descrito que existen diferencias en la transmisión de diferentes cepas de *T. cruzi* a través del vector (Nirschl *et al.*, 1994; de Lana *et al.*, 1998), esto se podría ver reflejado en que la infección por algunas cepas se exprese en mayores cargas parasitarias. Por otra parte, se han evidenciado en *Rhodnius prolixus* diferencias en la carga parasitaria en los diferentes segmentos del intestino, según el tiempo transcurrido post-infección (Dias *et al.*, 2015). En este estudio los triatomíneos evaluados fueron capturados en condiciones desconocidas de alimentación (silvestre), por lo tanto, el factor del tiempo transcurrido post-infección fue distinto para cada individuo, pudiendo ser éste un factor causal de la sobre-dispersión observada en la carga parasitaria.

Por otra parte, dado que los distintos estados de desarrollo de *M. spinolai* muestran conductas alimentarias diferentes frente a sus hospederos (Schaub, 1988a), se esperaba encontrar diferencias entre las cargas parasitarias entre los diferentes estados. Sin embargo, no se encontraron diferencias excepto en las ninfas III, donde se observó una mayor cantidad de ejemplares con menores cargas parasitarias por microgramo de ADN de triatomíneo. No hay datos para entender el presente fenómeno. En la revisión de literatura no hay antecedentes que permitan diferenciar a las ninfas III de los otros estadios. Se ha descrito por Schaub (1988) la existencia de coprofagia y canibalismo en los estados ninfales cuando comparten un micro hábitat, esto permitiría entender que los estadios menores que son los que presentan el fenómeno, se infecten en niveles similares que los mayores. A nivel de colonia se podría postular que se produce un traspaso de parásitos desde los mayores a los menores estadios, lo que homogenizaría las cargas entre los distintos estados de desarrollo. Dada la ausencia de trabajo sobre el particular este es un punto que debe tener mayor investigación. Al analizar esta variable en cada localidad, se comprobó que efectivamente había diferencias entre los diferentes estados, sin que esto siguiera un patrón determinado. Esto hace pensar que estas diferencias se deben al azar y pueden estar relacionadas con la probabilidad de acceder a las distintas fuentes alimentarias.

En relación con la eventual variación de la carga parasitaria en función del peso abdominal y tamaño corporal de *M. spinolai*, se tiene el antecedente entregado por Botto-Mahan y col (2009) quienes observaron una relación negativa entre el peso total y el estado de infección en la misma especie. Basados en este punto, se planteó que dentro de los infectados aquellos con mayor carga parasitaria

tendrían menor peso y tamaño. Sin embargo esto no sucedió, lo que sería indicativo de que la carga no sería un factor condicionante del peso y tamaño, sino que influiría en la condición corporal de *M. spinolai* la infección *per se* con el parásito. La explicación del bajo peso de los infectados versus los no infectados, se atribuye a una competencia por nutrientes entre el parásito y hospedero (Bottomahan, 2009). Si esta fuera la razón se entendería que a mayor número de parásitos debiera existir una mayor competencia por los nutrientes. Dado que esto al parecer no ocurre, una explicación podría ser que al aumentar el número de parásitos estos sufran algún grado de densa dependencia que produzca una eventual mayor mortalidad. Si esto fuese correcto se podría esperar cierto nivel de carga promedio que sería similar para todos los estados de desarrollo; la excepción del estadio III podría ser circunstancial, dado que como se afirmó anteriormente, se trabajó con especímenes cuyo estado nutricional inicial fue desconocido. Probablemente un experimento de laboratorio de infección con un número conocido de parásitos en *M. spinolai* podría despejar esta interrogante.

Al analizar la variación de la carga parasitaria de *M. spinolai* en las distintas localidades rurales del estudio, se obtuvieron diferencias significativas. Las localidades que se diferenciaron fueron Cochiguaz y Matancilla respecto las otras localidades. Esta diferencia no estaría determinada por el número de capturas o estados de desarrollo capturados de *M. spinolai*. Una propuesta es la diferencia en la disponibilidad de micromamíferos para alimentarse en las diferentes localidades. En la localidad de Matancilla en particular, el hábitat en el momento de la captura era más seco en comparación con el resto de las localidades por lo que la disponibilidad de micromamíferos podría haber sido más escasa. Sin embargo, se detectó una alta cantidad del sapo de rulo *Rhinella arunco*. Se ha descrito que los anfibios, reptiles y aves son refractarios a la infección por *T. cruzi*, ya que son capaces de destruir las formas tripomastigotes del parásito debido a un efecto lítico mediado por el complemento de su sangre (Kierszenbaum *et al.*, 1981). A pesar de ello, estos animales podrían jugar un papel indirecto pero considerable en el ciclo de transmisión de *T. cruzi*, ya que representan importantes fuentes de alimentación para los vectores triatominos, permitiendo la sobrevivencia del vector y a la vez diluyendo las cargas parasitarias.

Al analizar la variación de las temperaturas ambientales en las localidades de Matancilla y Cochiguaz, se obtiene que el diferencial de la temperatura mínima con la máxima, es más amplio en comparación con el resto de las localidades. Esto podría explicar que, al haber mayor variación, podría influir en la sobrevivencia del parásito.

CONCLUSIÓN

Se detectó un porcentaje considerablemente mayor a lo descrito de infección por *T. cruzi* en el vector silvestre *M. spinolai* en la región de Coquimbo (94,3%), debido principalmente al uso de técnicas moleculares de mayor sensibilidad.

Los niveles de infección similares entre los estados de desarrollo, permiten confirmar que las ninfas más jóvenes pueden ser tan importantes como los mayores en la transmisión del parásito *T. cruzi*.

Se observó una sobre-dispersión de las cargas parasitarias de *T. cruzi* en el vector silvestre *M. spinolai*. Las causas posibles son debido a las diferentes DTUs infectantes y/o a las diferencias en el tiempo transcurrido post-alimentación.

Se detectaron menores cargas parasitarias en el estado ninfal III de *M. spinolai* en comparación con los otros estados de desarrollo, pudiendo ser un hecho circunstancial.

No se encontró una relación entre la carga parasitaria de *T. cruzi* y el tamaño corporal o peso abdominal de *M. spinolai*.

Se detectaron diferencias en la carga parasitaria de *T. cruzi* presente en *M. spinolai* en las diferentes localidades del estudio en la región de Coquimbo, pudiendo atribuirse a la disponibilidad de alimento y diferencias en temperatura.

BIBLIOGRAFÍA

- ALEJANDRE, R.; NOGUEDA, B.; CALVO, M. L.; CORTÉS, M.** 1993. Estudio comparativo de la susceptibilidad de cinco especies de triatominos (Insecta). *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 35: 201-206.
- APT, W.; HEITMANN, I.; JERICIC, M. I.; JOFRÉ M, L.; MUÑOZ C. DEL V, P.; NOEMÍ H, I.; SAN MARTÍN V, A. M.; SAPUNAR P, J.; TORRES H, M.; ZULANTAY A, I.** 2008. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte I. Introducción y epidemiología. *Revista chilena de infectología*. 25: 189-193.
- APT, W.; REYES, H.** 1986. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Chile: I: distribución geográfica, índices de infección en vectores y en humanos / Epidemiological aspects of Chagas disease in Chile: I: the endemic area, vectors and human infection. *Parasitol. al Día*. 10(3): 94-101.
- APT, W.; REYES, H.** 1990. Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. *Parasitol. día*. 14: 23-40.
- ATIAS, A.** 1998. Enfermedad de Chagas. Triatomas, Chinchas y Cucarachas. *Parasitología Médica*. Atias, A. Primera edición. Editorial Mediterráneo. Santiago. Chile. PP. 251-264.
- ATIAS, A.; APT, W.** 1991. Enfermedad de Chagas: Parasitología Clínica. *Enfermedad de Chagas: Parasitología Clínica*.
- BACIGALUPO, A.; SEGOVIA, V.; GARCIA, A.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.; ACUNA-RETAMAR, M.; TORRES-PEREZ, F.; CATTAN, P. E.** 2012. Differential pattern of infection of sylvatic nymphs and domiciliary adults of *Triatoma infestans* with *Trypanosoma cruzi* genotypes in Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87: 473-480.
- BACIGALUPO, A.; SEGURA, J. A.; GARCIA, A.; HIDALGO, J.; GALUPPO, S.; CATTAN, P. E.** 2006. First finding of Chagas disease vectors associated with wild bushes in the Metropolitan Region of Chile. *Revista medica de Chile*. 134: 1230-1236.
- BACIGALUPO, A.; TORRES-PÉREZ, F.; SEGOVIA, V.; GARCÍA, A.; CORREA, J. P.; MORENO, L.; ARROYO, P.; CATTAN, P. E.** 2010. Sylvatic foci of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Chile: description of a new focus and challenges for control programs. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz*. 105: 633-641.
- BOTTO-MAHAN, C.** 2009. *Trypanosoma cruzi* induces life-history trait changes in the wild kissing bug *Mepraia spinolai*: implications for parasite transmission. *Vector borne and zoonotic diseases*. 9: 505-510.
- BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN, P. E.; CANALS, M.; ACUNA, M.** 2005a. Seasonal variation in the home range and host availability of the blood-sucking insect *Mepraia Spinolai* in wild environment. *Acta Trop.* 95: 160-163.
- BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN, P. E.; MEDEL, R.** 2006. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Acta Trop.* 98: 219-223.
- BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ROZAS, M.; CATTAN, P. E.; SOLARI, A.** 2005b. DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in the Chilean wild vector *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz*. 100: 237-239.
- BOTTO-MAHAN, C.; SEPULVEDA, M.; VIDAL, M.; ACUNA-RETAMAR, M.; ORTIZ, S.; SOLARI, A.** 2008. *Trypanosoma cruzi* infection in the sylvatic kissing bug *Mepraia gajardoi* from the Chilean Southern Pacific Ocean coast. *Acta Trop.* 105: 166-169.
- BRIONES, M. R.; SOUTO, R. P.; STOLF, B. S.; 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: 219-232.

- CAMPOS, R.; ACUNA-RETAMAR, M.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; CATTAN, P. E.; SOLARI, A.** 2007a. Susceptibility of *Mepraia spinolai* and *Triatoma infestans* to different *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected rodent hosts. *Acta Trop.* 104: 25-29.
- CAMPOS, R.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ACUNA, M.; CATTAN, P. E.; SOLARI, A.** 2007b. *Trypanosoma cruzi* detection in blood by xenodiagnosis and polymerase chain reaction in the wild rodent *Octodon degus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 324-326.
- CAMPOS, R.; TORRES-PEREZ, F.; BOTTO-MAHAN, C.; CORONADO, X.; SOLARI, A.** 2013. High phylogeographic structure in sylvatic vectors of Chagas disease of the genus *Mepraia* (Hemiptera: Reduviidae). *Infect. Genet. Evol.* 19: 280-286.
- CANALS, M.; CATTAN, P. E.; EHRENFELD, M.** 1994. Compared dynamics of *Triatoma infestans* cohorts in residential environment. *Revista medica de Chile.* 122: 993-997.
- CANALS, M.; CRUZAT, L.; MOLINA, M. C.; FERREIRA, A.; CATTAN, P. E.** 2001. Blood host sources of *Mepraia spinolai* (Heteroptera: Reduviidae), wild vector of Chagas disease in Chile. *Journal of medical entomology.* 38: 303-307.
- CANALS, M.; EHRENFELD, M.; SOLIS, R.; CRUZAT, L.; PINOCHET, A.; TAPIA, C.; CATTAN, P. E.** 1998. Biología comparada de *Mepraia spinolai* en condiciones de laboratorio y terreno:: Cinco años de estudio. *Parasitología al día.* 22: 72-78.
- CANALS, M.; SOLIS, R.; TAPIA, C.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.** 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. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 94: 687-692.
- CARVAJAL, A.; ORELLANA, J.; WIGANT, W.; BÓRQUEZ, C.; LOBATO, I.** 2007. Prevalencia de triatomínicos infectados con *Trypanosoma cruzi* en el litoral de la ciudad de Arica. *Parasitología latinoamericana.* 62: 118-121.
- CORONADO, X.; ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; CATTAN, P. E.; SOLARI, A.** 2009. Molecular epidemiology of Chagas disease in the wild transmission cycle: the evaluation in the sylvatic vector *Mepraia spinolai* from an endemic area of Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81: 656-659.
- COURA, J. R.** 2007. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 102 Suppl 1: 113-122.
- COURA, J. R.** 2013. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 108: 962-967.
- CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L.** 2003. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129: 53-59.
- DA SILVEIRA PINTO, 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: 843-848.
- DE CARVALHO, C.; 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: 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.* 90: 20-25.
- DE SOUZA, W.** 2000. O parasito e sua interação com os hospedeiros. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Z Brener, ZA Andrade, M Barral-Netto (eds.), Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 88-126.
- DIAS, F.; GUERRA, B.; REZENDE, L.; PERDOMO, H.; PAIVA, C.; VIONETTE DO AMARAL, R.; ESTEBANEZ, R.; OLIVEIRA, S.; ALVES, F.; FERREIRA, M.; MEDEI, E.; LAGERBLAD DE OLIVEIRA, P.; SALMON, D.** 2015. Monitoring of the Parasite Load in the Digestive Tract of *Rhodnius prolixus* by

Combined qPCR Analysis and Imaging Techniques Provides New Insights into the Trypanosome Life Cycle. PLoS. Negl. Trop. Dis. 9(10):

DORN, P.; ENGELKE, D.; RODAS, A.; ROSALES, R.; MELGAR, S.; BRAHNEY, B.; FLORES, J.; MONROY, C. 1999. Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60: 740-745.

DUFFY, T.; BISIO, M.; ALTCHER, J.; BURGOS, J. M.; DIEZ, M.; LEVIN, M. J.; FAVALORO, R. R.; FREILIJ, H.; SCHIJMAN, A. G. 2009. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. PLoS. Negl. Trop. Dis. 3: e419.

ELIAS, M. C.; VARGAS, N.; TOMAZI, L.; PEDROSO, A.; ZINGALES, B.; SCHENKMAN, S.; BRIONES, M. R. 2005. Comparative analysis of genomic sequences suggests that *Trypanosoma cruzi* CL Brener contains two sets of non-intercalated repeats of satellite DNA that correspond to *T. cruzi* I and *T. cruzi* II types. Mol. Biochem. Parasitol. 140: 221-227.

ELIAS, M. C.; VARGAS, N. S.; ZINGALES, B.; SCHENKMAN, S. 2003. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 129: 1-9.

FRÍAS-LASSERRE, D. 2010. A new species and karyotype variation in the bordering distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardoi* Frías et al (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its parapatric model of speciation. Neotropical Entomology. 39: 572-583.

FRÍAS, D.; HENRY, A.; GONZALEZ, C. 1998. *Mepraia gajardoi*: a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia spinolai* Rev Chile Hist Nat. 71: 177-188.

FRÍAS, D.; SOLARI, A.; GONZÁLEZ, C.; HENRY, A.; ALVIÑA, A. 1995. Índices de infección de *Mepraia spinolai* con *Trypanosoma cruzi*, su invasión a ambientes domésticos e interacción con *Triatoma infestans*. Parasitol. al Día. 19: 195.

GORLA, D. E.; JURBERG, J.; CATALA, S. S.; SCHOFIELD, C. J. 1993. Systematics of *Triatoma sordida*, *T. guasayana* and *T. patagonica* (Hemiptera, Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 88: 379-385.

GUHL, F. 2007. Chagas disease in Andean countries. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 102 Suppl 1: 29-38.

HOTEZ, P. J.; DUMONTEIL, E.; WOC-COLBURN, L.; SERPA, J. A.; BEZEK, S.; EDWARDS, M. S.; HALLMARK, C. J.; MUSSELWHITE, L. W.; FLINK, B. J.; BOTTAZZI, M. E. 2012. Chagas disease: "the new HIV/AIDS of the Americas". PLoS. Negl. Trop. Dis. 6: e1498-e1498.

IENNE, S.; PEDROSO, A.; CARMONA, E. F. R.; BRIONES, M. R.; ZINGALES, B. 2010. Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. Infect. Genet. Evol. 10: 601-606.

KIERSZENBAUM, F.; GOTTILIEB, C. A.; BUDZKO, D. B. 1981. Antibody-independent, natural resistance of birds to *Trypanosoma cruzi* infection. J. Parasitol. 67: 656-660.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. Parasitol. Today. 16: 381-387.

LENT, H.; JURBERG, J.; GALVAO, C. 1994. Revadacao do genero *Mepraia*, Mazza, Gajardo & Jörg, 1940, (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 89(3): 347-352.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Bulletin of the American Museum of Natural History. 163: 123-520.

LORCA, M.; GARCÍA, A.; BAHAMONDE, M. I.; FRITZ, A.; TASSARA, R. 2001. Certificación serológica de la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Chile. Revista medica de Chile. 129: 264-269.

MILES, M. A.; LLEWELLYN, M. S.; LEWIS, M. D.; YEO, M.; BALEELA, R.; FITZPATRICK, S.; GAUNT, M. W.; MAURICIO, I. L. 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. Parasitology. 136: 1509-1528.

MOLINA, M. C.; CATTAN, P.; CANALS, M.; CRUZAT, L.; AGUILLON, J. C.; FERREIRA, A. 2004. A simple immunometric assay to assess the feeding habits of *Meprai spinolai*, a *Trypanosoma cruzi* vector. *Parasitol. Res.* 92: 375-379.

MOREIRA, O. C.; RAMIREZ, J. D.; VELAZQUEZ, E.; MELO, M. F.; LIMA-FERREIRA, C.; GUHL, F.; SOSA-ESTANI, S.; MARIN-NETO, J. A.; MORILLO, C. A.; BRITTO, C. 2013. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop.* 125: 23-31.

MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1477-1482.

NIRSCHL, R. A.; SOARES JUNIOR, J. M.; PIRANI, E. M.; FRANCISCON, J. U.; RAMIREZ, L. E. 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: 235-239.

OPS. 2010. XVIIa. Reunión de la Comisión Intergubernamental (CI) de la Iniciativa Subregional Cono Sur de Eliminación de *Triatoma infestans* y la Interrupción de la Transmisión Transfusional de la Tripanosomiasis Americana In: Santiago de Chile. HSD/CD/CH/03-11

ORDENES, H.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P. E.; CANALS, M. 1996. Tripano-triatomine infection of *Triatoma spinolai* in a zone with epidemiological risk. *Revista medica de Chile.* 124: 1053-1057.

ORTIZ, S.; ZULANTAY, I.; APT, W.; SAAVEDRA, M.; SOLARI, A. 2015. Transferability of *Trypanosoma cruzi* from mixed human host infection to *Triatoma infestans* and from insects to axenic culture. *Parasitol. Int.* 64: 33-36.

PIRON, M.; FISA, R.; CASAMITJANA, N.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; PUIG, L.; VERGÉS, M.; GASCÓN, J.; GÓMEZ I PRAT, J.; PORTÚS, M.; SAULEDA, S. 2007. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 103: 195-200.

PIZARRO, J. 1996. Estudio parasitológico-entomológico de triatomíneos procedentes de la Provincia Zudañez, Departamento de Chuquisaca. *Arch. boliv. med.* 3: 29-33.

PIZARRO, J.; LUCERO, D.; STEVENS, L. 2007. PCR reveals significantly higher rates of *Trypanosoma cruzi* infection than microscopy in the Chagas vector, *Triatoma infestans*: high rates found in Chuquisaca, Bolivia. *BMC infectious diseases.* 7: 1.

POULIN, R. 2007. Are there general laws in parasite ecology? *Parasitology.* 134: 763-776.

RAMIREZ, J. C.; CURA, C. I.; DA CRUZ MOREIRA, O.; LAGES-SILVA, E.; JUIZ, N.; VELAZQUEZ, E.; RAMIREZ, J. D.; ALBERTI, A.; PAVIA, P.; FLORES-CHAVEZ, M. D.; MUNOZ-CALDERON, A.; PEREZ-MORALES, D.; SANTALLA, J.; MARCOS DA MATTA GUEDES, P.; PENEAU, J.; MARCET, P.; PADILLA, C.; CRUZ-ROBLES, D.; VALENCIA, E.; CRISANTE, G. E.; GREIF, G.; ZULANTAY, I.; COSTALES, J. A.; ALVAREZ-MARTINEZ, M.; MARTINEZ, N. E.; VILLARROEL, R.; VILLARROEL, S.; SANCHEZ, Z.; BISIO, M.; PARRADO, R.; MARIA DA CUNHA GALVAO, L.; JACOME DA CAMARA, A. C.; ESPINOZA, B.; ALARCON DE NOYA, B.; PUERTA, C.; RIASTE, A.; DIOSQUE, P.; SOSA-ESTANI, S.; GUHL, F.; RIBEIRO, I.; AZNAR, C.; BRITTO, C.; YADON, Z. E.; SCHIJMAN, A. G. 2015. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J. Mol. Diagn.* 17: 605-615.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. 2010. Chagas disease. *Lancet.* 375: 1388-1402.

REQUENA, J. M.; LOPEZ, M. C.; ALONSO, C. 1996. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today.* 12: 279-283.

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

SAGUA FRANCO, H.; ARAYA ROJAS, J.; GONZÁLEZ CORTES, J.; NEIRA CORTES, I. 2000. *Meprai spinolai* in the Southeastern Pacific Ocean Coast (Chile)-First insular record and feeding pattern on the Pan de Azucar Island. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 95: 167-170.

SCHAUB, G. A. 1988a. Developmental time and mortality of larvae of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 94-96.

SCHAUB, G. A. 1988b. Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between vectors of Chagas' disease. *Acta Trop.* 45: 11-19.

SCHAUB, G. A. 1992. The effects of trypanosomatids on insects. *Adv. Parasitol.* 31: 255-319.

SCHAUB, G. A. 1994. Pathogenicity of trypanosomatids on insects. *Parasitol. Today.* 10: 463-468.

SCHENONE, H.; DEL, C. C. M.; SALINAS, P.; SANDOVAL, L.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. 1995. Epidemiology of Chagas disease in Chile. Frequency of human *Trypanosoma cruzi* infection by age groups and regions. *Bol. Chil. Parasitol.* 50: 84-86.

SCHIJMAN, A. G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; MEJIA JARAMILLO, A. M.; CURA, C.; AUTER, F.; VERON, V.; QVARNSTROM, Y.; DEBORGGRAEVE, S.; HIJAR, G.; ZULANTAY, I.; LUCERO, R. H.; VELAZQUEZ, E.; TELLEZ, T.; SANCHEZ LEON, Z.; GALVÃO, L.; NOLDER, D.; MONJE RUMI, M.; LEVI, J. E.; RAMIREZ, J. D.; ZORRILLA, P.; FLORES, M.; JERICIC, M. I.; CRISANTE, G.; AÑEZ, N.; DE CASTRO, A. M.; GONZALEZ, C. I.; ACOSTA VIANA, K.; YACHELINI, P.; TORRICO, F.; ROBELLO, C.; DIOSQUE, P.; TRIANA CHAVEZ, O.; AZNAR, C.; RUSSOMANDO, G.; BÜSCHER, P.; ASSAL, A.; GUHL, F.; SOSA ESTANI, S.; DASILVA, A.; BRITTO, C.; LUQUETTI, A.; LADZINS, J. 2011. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 5: e931-e931.

SCHOFIELD, C. 1994. *Triatominae: biología y control*, Eurocommunica Publications. W. Sussex. 80:

SOLARI, A.; CAMPILLAY, R.; ORTIZ, S.; WALLACE, A. 2001. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Exp. Parasitol.* 97: 226-233.

TEXEIRA, A.; NITZ, N.; GUIMARO, M.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. 2006. Chagas Disease. *Postgrad Med J.* 82: 788-798.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 2015. Chagas disease (American trypanosomiasis). [en línea] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. [consulta 31-10-2015].

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104: 1051-1054.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; CAMPBELL, D. A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A. M.; TEIXEIRA, M. M. G.; SCHIJMAN, A. G.; LLEWELLYN, M. S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C. R.; ANDRADE, S. G.; STURM, N. R. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* 12: 240-253.

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. Microbiol. Infect. Dis.* 48: 253-257.