



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

**DETERMINACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS MOLECULAR DE
FUENTES DE ALIMENTACIÓN DE *Mepraia spinolai* EN LA
REGIÓN DE COQUIMBO**

María José Vergara Salinas

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

PROFESOR GUÍA: CATALINA MUÑOZ SAN MARTÍN
Universidad de Chile

PROYECTO FONDECYT
1140650 / 3170799
SANTIAGO, CHILE
2018



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

**DETERMINACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS MOLECULAR DE
FUENTES DE ALIMENTACIÓN DE *Mepraia spinolai* EN LA
REGIÓN DE COQUIMBO**

María José Vergara Salinas

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

Nota Final:

Profesor Guía: Dra. Catalina Muñoz

Profesor Corrector: Dra. Galia Ramírez

Profesor Corrector: Dr. Leonardo Sáenz

Universidad de Chile

PROYECTO FONDECYT 1140650/ 3170799

SANTIAGO, CHILE
2018

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que estuvieron en este largo camino que significó la obtención del título de médico veterinario. Todas de alguna forma aportaron para que esto fuese posible.

Agradezco en especial a mis padres, José Manuel Vergara y Francisca Salinas, por su amor, paciencia y apoyo incondicional. Todo esto se hizo realidad gracias a ellos.

A Catalina por su guía, apoyo y amistad a lo largo de esta Memoria. Gran parte de este proyecto se llevó a cabo gracias a ella.

A Antonella por sus consejos y correcciones en el desarrollo de todas las presentaciones y el escrito.

Al Dr. Cattan por sus consejos, conversaciones y guía.

A Miguel por su ayuda en la realización de esta Memoria.

A todos los demás integrantes del Laboratorio de Ecología, por su simpatía y los consejos previos a las presentaciones.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
Enfermedad de Chagas	2
Agente etiológico	3
Vectores triatominos	3
<i>Mepraia spinolai</i>	4
Detección de fuentes de alimentación en triatominos	5
Antecedentes del perfil alimentario de <i>Mepraia spinolai</i>	6
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
RESULTADOS	13
Amplificación del ADN de las fuentes de alimentación	13
Análisis de <i>High Resolution Melting</i> (HRM)	13
Análisis del Perfil de Alimentación de <i>M. spinolai</i>	16
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28
ANEXOS	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nro. 1. Resultados de la amplificación del ADN de las fuentes de alimentación en las muestras de <i>M. spinolai</i>. Número y porcentaje de muestras positivas y negativas según estado de desarrollo.	13
Tabla Nro. 2. Temperatura de fusión (Tm) de los controles de referencia. 17 Especies estándar incluidas en este estudio con sus respectivas temperaturas de fusión. SD: desviación estándar.	15
Tabla Nro. 3. Fuentes de alimentación de <i>M. spinolai</i> agrupadas según tipo de especie. Número y porcentaje de muestras.....	17

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura Nro. 1. Perfil HRM de los controles de referencia.** Curva de disminución de la fluorescencia con el aumento de la temperatura. A) Especies Silvestres. B) Especies Sinantrópicas y Humana. 14
- Figura Nro. 2. Curva de fusión de la muestra 575.** Tm1: primer *peak* de la curva de fusión correspondiente al genotipo *O. degus*, Tm2: segundo *peak* de la curva de fusión correspondiente al genotipo *H. sapiens*. 16
- Figura Nro. 3. Perfil de Alimentación de *M. spinolai*.** Porcentaje de muestras positivas a cada especie de vertebrado. 17
- Figura Nro. 4. Tipo de fuentes de alimentación según estado de desarrollo.** Porcentaje de individuos de *M. spinolai* positivos a cada tipo de fuente de alimentación según cada estado de desarrollo. 18
- Figura Nro. 5. Tipo de fuentes de alimentación según lugar de muestreo.** Porcentaje de individuos de *M. spinolai* positivos a cada tipo de fuente de alimentación según cada lugar de muestreo. 19

RESUMEN

Conocer el perfil de alimentación de triatomíneos silvestres puede ayudar a identificar sus posibles hábitats peridomésticos y su incursión en hábitats humanos para así generar estrategias preventivas y de control para la Enfermedad de Chagas. El objetivo del estudio fue determinar la dieta de *Mepraia spinolai*, vector de mayor relevancia en el ciclo de transmisión silvestre de *Trypanosoma cruzi* en Chile, mediante la técnica *High Resolution Melting* (HRM). Se trabajó con un banco de ADN de 1.462 individuos de *M. spinolai* capturados en ocho localidades rurales de la Región de Coquimbo; los controles de referencia de este estudio correspondieron a 17 especies de vertebrados. Para verificar la presencia del ADN de las fuentes de alimentación se realizó una amplificación previa a través de qPCR con partidores específicos para vertebrados. Aquellas muestras que no amplificaron fueron descartadas. Para el análisis HRM se amplificó un fragmento de 383 pb del gen Citocromo b mediante qPCR y luego se aumentó la temperatura de 72 °C a 92 °C. Se identificó el 73,4% de las fuentes de alimentación con un predominio de especies silvestres (60,5%) siendo el ratón oliváceo la especie más detectada (17,4%). El 11,1% de las muestras fueron positivas a humano. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la dieta de este vector entre estados de desarrollo y lugares de muestreo. Esta especie seguiría siendo generalista en sus preferencias alimentarias, pues se alimenta de especies comunes en la región, por lo que constituiría un riesgo cuando se encuentra cercana a asentamientos humanos.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, triatómimo silvestre, *Mepraia spinolai*, perfil de alimentación, High Resolution Melting.

ABSTRACT

Knowing the feeding profile of wild triatomines can help to identify their possible peridomestic habitats and their incursion into human habitats in order to generate preventive and control strategies for Chagas' disease. The objective of this study was to determine the diet of *Mepraia spinolai*, the most relevant vector in the wild transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* in Chile, using High Resolution Melting (HRM) analysis. We worked with a DNA bank of 1,462 individuals of *M. spinolai* captured in eight rural locations of the Coquimbo region; the reference controls of this study corresponded to 17 vertebrate species. To verify the presence of DNA from the feeding sources, a previous amplification was carried out through qPCR with specific primers for vertebrates. Those samples that did not amplify were discarded. For the HRM analysis, a 383 bp fragment of the Cytochrome b gene was amplified by qPCR and then the temperature was increased from 72 ° C to 92 ° C. We identified 73.4% of total food sources, the predominance of which were wild species (60.5%), with the olive mouse being the most detected species (17.4%). From the total, 11.1% of the samples were positive to human. Statistically significant differences were found in the diet of this vector between developmental stages and sampling sites. This species would continue being generalist in its food preferences, since it is fed on common species in the region, so it would be a risk when it is close to human settlements.

Key words: Chagas disease, wild triatomine, *Mepraia spinolai*, feeding profile, High Resolution Melting.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, transmitida por el parásito flagelado *Trypanosoma cruzi*, es una de las zoonosis más importantes del continente americano. Se estima que alrededor de 6 a 7 millones de personas en el mundo están infectadas con *T. cruzi* y se encuentran principalmente en zonas endémicas de América Latina (WHO, 2018). En Chile, el área endémica por la presencia del vector se extiende entre la Región de Arica y Parinacota, por el norte, a la Región de O'Higgins, por el sur, incluyendo a la Región Metropolitana (ISPC, 2014). Existen alrededor de 142.000 habitantes infectados en el país, donde el 56% de los casos pertenece al Servicio de Salud de la Región de Coquimbo (Apt *et al.*, 2008). Aunque existe evidencia de un descenso en las tasas de infestación domiciliaria a nivel nacional, ésta no repercute aún sobre los indicadores de enfermedad en el humano, tales como prevalencia, incidencia y mortalidad. Más aún, la situación de los vectores es también preocupante, ya que a pesar de la disminución de la infestación domiciliaria, hay vectores silvestres que podrían cobrar importancia epidemiológica (Canals *et al.*, 2017).

En las últimas dos décadas se ha incorporado el componente ecológico en el estudio de enfermedades infecciosas transmitidas por vectores, representando un avance en cómo se abordan las enfermedades infecciosas que afectan a seres humanos, fauna doméstica y silvestre (Botto-Mahan *et al.*, 2015). En Chile, los esfuerzos por incorporar a los vectores silvestres de la enfermedad de Chagas en proyectos de investigación han aumentado, y esto ha permitido recabar información en aspectos básicos de los triatomos silvestres (Acuña *et al.*, 2009; Botto-Mahan, 2009; Frías-Laserre *et al.*, 2017). El conocimiento del perfil de alimentación de triatomos 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 (Chacón *et al.*, 2016).

Así, el objetivo del presente estudio es determinar el perfil de alimentación del vector silvestre *Mepraia spinolai* en diferentes localidades rurales de la Región de Coquimbo, con el fin de contribuir en la actualización del conocimiento del perfil de alimentación de esta especie, a través de la identificación de especies de hospederos y sus correlaciones con estados de desarrollo del vector y lugares de muestreo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una de las zoonosis mediadas por vectores más importantes en América Latina (Gürtler *et al.*, 2008). Es producida por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitida al ser humano por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae, conocidos comúnmente como vinchucas (Zulantay *et al.*, 2011).

El mecanismo de transmisión vectorial ha sido tradicionalmente el de mayor importancia epidemiológica: el vector defeca después de succionar sangre y la infección se transmite cuando las personas toman contacto con las heces u orina que contienen el estadio infeccioso de *T. cruzi*, a través de escoriaciones de la piel (incluyendo la picadura) y membranas mucosas (WHO, 2015). Sin embargo existen otras vías de transmisión, como la transmisión alimentaria (OPS, 2009); la infección congénita, actualmente una de las más importantes vías de transmisión en Chile (MINSAL, 2014); y la vía transfusional (Moretti *et al.*, 2007), la cual presenta bajo riesgo en Chile, debido a la realización del tamizaje de sangre (Torres, 2010; MINSAL, 2008); también se ha descrito transmisión por trasplante de órganos y tejidos (Machado *et al.*, 2009) y accidentes en la práctica clínica o de laboratorio (MINSAL, 2014). La enfermedad se manifiesta en dos fases: aguda y crónica. En la fase crónica se han identificado dos formas de presentación: asintomática y sintomática (Apt y Zulantay, 2011).

Latinoamérica ha logrado éxitos progresivos en el control, a través de la pulverización sistemática con insecticidas residuales, tamiz de donantes de sangre e información y educación a la comunidad (WHO, 2015). Sin embargo, de los veintiún países con antecedentes de transmisión activa, sólo en cinco países se ha logrado establecer áreas de interrupción vectorial (MINSAL, 2014), entre ellos Chile, que en 1999 logró la interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi* por *Triatoma infestans* (WHO, 2015). A pesar de esto aún existen hallazgos de triatominos intradomiciliarios a nivel nacional (ISPCH, 2014). Actualmente, la infección por *T. cruzi* afecta al 0,7% de la población en Chile, con una prevalencia de 1,5% en zona rural y de 0,6% en zona urbana, siendo notoriamente mayor en la Región de Atacama y en la Región de Coquimbo con un 4,7% y 1,8%, respectivamente, decreciendo de manera progresiva en las restantes regiones (ISPCH, 2014).

Agente etiológico

Trypanosoma cruzi parasita a los triatominos cuando éstos consumen sangre de mamíferos infectados con el parásito (Tyler y Engman, 2001). A la vez, existe transmisión directa de *T. cruzi* entre vectores de Chagas, mediante canibalismo, en el cual un individuo pica el abdomen de otro de mayor tamaño que se haya alimentado de una presa, y también mediante la coprofagia, en la cual un triatomino se alimenta de las deyecciones frescas de otro vector (Schaub, 1988). *T. cruzi* infecta un amplio rango de hospederos, se ha encontrado un total de 180 especies de mamíferos naturalmente infectados por *T. cruzi* pertenecientes a los siguientes órdenes: Didelphidomorpha, Lagomorpha, Chiroptera, Rodentia, Pilosa, Cingulata, Carnivora, Perisodactyla y Primates. El humano, además de padecer de la enfermedad, actúa como reservorio (Solari, 2011). Este parásito no infecta a aves ni reptiles (Kierszenbaum *et al.*, 1976), sin embargo, estas especies han sido descritas como fuentes de alimentación para triatominos (Apt y Reyes, 1990; Canals, 2001).

Vectores triatominos

Los triatominos son insectos que pertenecen al Orden Hemiptera, Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae (Kollien y Schaub, 2000). Están muy difundidos en América, distribuyéndose entre los paralelos 42° de latitud norte y 46° de latitud sur (Schofield, 1994). Presentan un cuerpo alargado y aplanado dorsoventralmente en ayuno, con patrones distintivos en el conexivo que varían según la especie (Lent y Wygodzinsky, 1979). Su ciclo de vida está compuesto por huevo, cinco estadios ninfales y adulto. Desde su eclosión son hematófagos obligados y, potencialmente, vectores de *T. cruzi* (Nattero *et al.*, 2011).

Existen especies de triatominos de hábitos domésticos, asociados principalmente a viviendas humanas rurales y su principal fuente de alimento la constituyen seres humanos y animales domésticos (Schofield, 1994). Por otro lado, los triatominos de hábitos silvestres habitan en pedregales, madrigueras de animales, troncos y nidos de aves, entre otros. Se ha descrito que estas especies se alimentan principalmente de mamíferos silvestres; y dentro de estos, predominantemente del orden Rodentia y Lagomorpha (Rengifo, 2000; Canals *et al.*, 2001; Chacón *et al.*, 2016).

En Chile, los triatominos comprenden cuatro especies: *Triatoma infestans*, de hábitos comúnmente domiciliarios; *Mepraia spinolai*, *Mepraia gajardoi* y *Mepraia parapatrica*, de hábitos silvestres (Apt y Reyes, 1986; Frías-Lasserre, 2010). *T. infestans* es una especie de amplia distribución en diversos países sudamericanos. En Chile se encuentra entre las regiones de Arica y Parinacota y del Libertador General Bernardo O'Higgins (MINSAL, 2011). Las especies del género *Mepraia* son endémicas de Chile. *M. spinolai* se encuentra actualmente entre la Región de Atacama y la Región de O'Higgins (Frías-Lasserre, 2010), *M. gajardoi* se distribuye sólo en la costa norte de Chile y se asocia a nidos de aves marinas y cuevas de reptiles (Botto-Mahan *et al.*, 2008) y *M. parapatrica* se distribuye a lo largo de la costa norte, entre la II y III región, así como en la Isla Pan de Azúcar (Frías-Lasserre, 2010).

Mepraia spinolai

Mepraia spinolai es el vector de mayor relevancia en el ciclo de transmisión silvestre de *T. cruzi* en Chile (Botto-Mahan *et al.*, 2015). Habita principalmente zonas áridas y semiáridas de los valles del interior y se encuentra comúnmente asociada con micromamíferos en ecotopos silvestres rocosos (Canals *et al.*, 2001; Bacigalupo *et al.*, 2006; 2010), en gallineros y corrales de cabras en ecotopos peridomésticos (Campos *et al.*, 2007) y, ocasionalmente, se ha reportado en el domicilio (Canals *et al.*, 1999). Presenta en marcado polimorfismo sexual, con hembras siempre micrópteras (sin alas), machos braquípteros (alas más cortas que la longitud del abdomen) y macrópteros (alas más grandes que la longitud del abdomen) y se caracteriza por exhibir hábitos diurnos (Frías-Lasserre, 2010; Campos *et al.*, 2013).

Se ha descrito a través de métodos moleculares que el nivel de infección de poblaciones de *M. spinolai* ha alcanzado desde un 46,2% hasta 94,3% en zonas semiáridas de la Región de Coquimbo (Botto-Mahan *et al.*, 2005a; Barrera, 2017). Los individuos de esta especie infectados con *T. cruzi* detectan más rápido a sus hospederos, los pican más veces implicando un mayor número de perforaciones en la piel, y defecan en menos tiempo que los insectos no infectados. Todos estos antecedentes, sumados al hecho de que los insectos infectados viven más tiempo, revelan una importante presión ejercida por el parásito para ser transmitido a su hospedero mamífero (Botto-Mahan, 2009).

El conocimiento del perfil de alimentación de los triatominos silvestres puede ayudar a comprender sus potenciales hábitats peridomésticos, sus posibles incursiones en los hábitats humanos (Salvatella *et al.*, 1995) y una variedad de otras relaciones entre los vectores y los hospedadores de *T. cruzi*. Esto es importante para generar estrategias preventivas y enfocar esfuerzos para controlar la enfermedad de Chagas (Chacón *et al.*, 2016).

Detección de fuentes de alimentación en triatominos

Hasta ahora, los métodos utilizados para determinar el perfil de alimentación de triatominos incluyen técnicas serológicas y moleculares. Las técnicas inmunoenzimáticas basadas en el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) han sido las más utilizadas en la determinación de la fuente de alimentación de los vectores (Jirón y Zeledón, 1982; Gurtler *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 2003; Pineda *et al.*, 2008, Chacón *et al.*, 2016). En esta técnica se generan y utilizan distintos paneles de antisueros contra antígenos séricos de cada hospedero vertebrado involucrado. Sin embargo, esta técnica carece de especificidad, ya que reacciona de forma cruzada con especies que presentan cercanía filogenética, por ende, necesita la eliminación de reacciones cruzadas indeseables (Hunter y Bayley, 1991; Buitrago *et al.*, 2012), consume mucho tiempo y es costosa, ya que requiere la preparación de antisueros específicos para cada hospedero (Chow *et al.*, 1993). Las técnicas moleculares basadas en reacción en cadena de la polimerasa (PCR), consisten en múltiples reacciones que pueden discriminar rápidamente entre hospederos potenciales por tamaños moleculares de productos de PCR (Mota *et al.*, 2007). Este análisis es más específico y usualmente más fácil de realizar; sin embargo, el diseño de partidores específicos para cada especie implicada hace difícil identificar los mamíferos del ciclo silvestre, donde existe una amplia variedad de especies, además, en esta técnica cada muestra tiene que ser amplificada por PCR muchas veces (Mota *et al.*, 2007; Pizarro *et al.*, 2007; Pizarro *et al.*, 2008). Con un enfoque más potente, se ha desarrollado la técnica *heteroduplex* del citocromo b (Cytb-HDA) (Townzen *et al.*, 2008). El gen citocromo b (*Cytb*) está involucrado en el transporte de electrones en la cadena respiratoria de la mitocondria (Irwin *et al.*, 1991). Este marcador molecular es altamente resolutivo y tiene la ventaja de que muchas secuencias de este gen están disponibles y son útiles para efectos comparativos (Marcili *et al.*, 2009). Esta técnica puede detectar diferencias en las secuencias de ADN de este gen entre las especies por diferencias en perfiles

electroforéticos (Lee *et al.*, 2001; Bosseno *et al.*, 2006). Aunque se utiliza cada vez más en los triatomíneos, la normalización suele ser difícil y cuando los insectos se han alimentado de más de una especie, la aplicación y el análisis pueden ser complejos, ya que se ha reportado que puede generar patrones electroforéticos iguales para especies diferentes (Peña *et al.*, 2012). Más recientemente, se ha desarrollado la técnica *High resolution melting* (HRM), que al igual que la técnica anterior detecta diferencias en las secuencias de ADN del gen *Cytb*, pero se lleva a cabo utilizando un colorante fluorescente que se une a la doble cadena de ADN (Chateigner-Boutin y Small, 2007). El amplicón se analiza por desnaturalización gradual, a través del aumento de la temperatura y la disminución de la fluorescencia causada por la liberación de colorante. La forma específica de la curva de disminución de la fluorescencia resulta de la secuencia del ADN, del contenido de GC y de la longitud del amplicón (Wittwer, 2009; Vossen *et al.*, 2009), por lo que es una técnica útil para obtener genotipos específicos de cada especie. Según lo descrito por estudios previos, el análisis de HRM del gen *Cytb* es la técnica más potente en este tipo de estudio porque puede identificar con precisión la especie, incluso cuando el vector tiene alimentación mixta, tiene un poder de resolución alto, es rápido y fácil de realizar. Sin embargo, es importante obtener ADN de alta calidad y tener en cuenta la fauna del área de estudio para tener un número adecuado de especies estándar (Peña *et al.*, 2012).

Antecedentes del perfil alimentario de *Mepraia spinolai*

Se ha reportado que *M. spinolai* no tiene preferencia por una especie en particular, sino que preferiría a éstas según su abundancia relativa (Canals *et al.*, 1998; Botto-Mahan *et al.*, 2012). Rengifo (2000) mediante la técnica ELISA determinó el perfil de alimentación de 211 individuos de *M. spinolai* pertenecientes a una localidad de la Región de Coquimbo y una localidad de la Región Metropolitana. Determinó el 42% de las fuentes de alimentación con un predominio de conejo europeo y lauchón orejado. El 16,4% de las muestras fue positiva a humano. Canals y colaboradores (2001) mediante ensayo inmunoradiométrico (IRMA), donde se utilizaron reacciones antígeno-anticuerpo radiomarcadas con ¹²⁵I, determinaron el 43,07% de las fuentes de alimentación, obteniendo un predominio de conejo europeo, perro doméstico y cabra. Solo el 5% de las muestras fueron positivas a humano.

Más recientemente, en un estudio realizado por Chacón y cols (2016) utilizando la técnica de ELISA determinaron el perfil de alimentación de 173 individuos de *M. spinolai* pertenecientes a dos localidades de la Región de Coquimbo, dos localidades de la Región de Valparaíso y una localidad de la Región Metropolitana. Se identificó sólo el 21,9% de las fuentes de alimentación con un predominio de lauchón orejudo y degú. No se obtuvo ninguna muestra positiva a humano.

En resumen, en cuanto a la determinación de fuentes de alimentación de *M. spinolai* en Chile se han utilizado solamente técnicas inmunoenzimáticas, determinando menos del 45% de las fuentes de alimentación y presentan discrepancias en cuanto a la participación de humanos en la dieta de este vector (Rengifo, 2000; Canals *et al.*, 2001; Chacón *et al.*, 2016). Por ende, los resultados son poco representativos de lo que realmente está consumiendo esta especie. Ante este panorama el uso de técnicas moleculares surge como una posible alternativa.

Esta Memoria de Título tiene como objetivo obtener datos más precisos sobre el perfil de alimentación de *M. spinolai* en la Región de Coquimbo, utilizando por primera vez la técnica molecular *High Resolution Melting*, abarcando un área más amplia y un mayor número de muestras que estudios anteriores. Lo anterior permitirá establecer diferencias entre hospederos y sus correlaciones con los estados de desarrollo del vector y con los lugares de muestreo, para así contribuir en la actualización del conocimiento del perfil de alimentación de esta especie y sus posibles alcances epidemiológicos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la fuente de alimentación del vector *Mepraia spinolai* mediante análisis molecular en la Región de Coquimbo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar las especies que forman parte de la dieta de *Mepraia spinolai* mediante la amplificación y diferenciación de polimorfismos genéticos.
2. Determinar la proporción de especies sinantrópicas y silvestres que son fuente de alimentación de *M. spinolai* según estado de desarrollo y lugares de muestreo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El muestreo se realizó en ocho sitios representativos de la Región de Coquimbo, que fueron seleccionados para el muestreo del proyecto FONDECYT 1140650, considerando las características del paisaje y un modelo de nicho ecológico realizado por Hernández *et al.* (2013). Los sitios seleccionados fueron:

- Provincia del Elqui: (1) Gualiguaica, Comuna de Vicuña (30°00'15"S; 70°49'00"O); (2) Peralillo, Comuna de Vicuña (30°03'33"S; 70°68'33"O) y (3) Cochiguaz, Comuna de Paihuano (30°8'29"S; 70°24'20"O).
- Provincia Limarí: (4) Tulahuén, Comuna de Monte Patria (31°01'67"S; 70°73'33"O); (5) Valle Hermoso, Comuna de Combarbalá (31°15'00"S; 70°45'00"O) y (6) La Rinconada, Comuna de Punitaqui (30°54'00"S; 71°16'00"O).
- Provincia de Choapa: (7) Matancilla, Comuna de Illapel (31°45'64"S; 71°04'77"O) y (8) Tranquilla, Comuna de Salamanca (31°52'59"S; 70°43'50"O).

Muestras del estudio

Se trabajó con un banco de ADN extraído previamente del contenido intestinal de 1.462 individuos de la especie *Mepraia spinolai*, (Barrera, 2017), los cuales fueron agrupados según estado de desarrollo: ninfas I (576), ninfas II (359), ninfas III (360), ninfas IV (72), ninfas V (40) y adultos (55). El total de cada estado fue proporcional a la estructura etaria que tiene naturalmente esta especie en terreno en época de verano (Canals *et al.*, 1998).

Amplificación del ADN de las fuentes de alimentación

Para verificar la presencia y calidad de ADN de las fuentes de alimentación en las muestras de triatominos, se realizó una amplificación previa a través de PCR en tiempo real con partidores específicos de parte del gen del Citocromo b para vertebrados Fw 5' CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3' y Rv 5' CCATCCAACATCTCAGCATGATG AAA 3' (Boakye *et al.*, 1999). La reacción estuvo compuesta por 2 µL de muestra, 4 µL de *HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus* (Solis BioDyne), 1 µL (500 nM) de cada partidor y 12 µL de agua libre de nucleasas para un volumen final de 20 µL. La reacción se

llevó a cabo en un termociclador *Rotor-Gene® Q* (2plex HRM Platform) con un programa de amplificación que constó de una incubación a 95°C por 15 minutos y 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos y 72°C por 20 segundos. Aquellas muestras que no presentaron amplificación o presentaron amplificaciones inespecíficas no se analizaron por la técnica HRM.

Controles de referencia

En este estudio se incluyeron muestras de ADN extraídas de sangre de 17 especies, las cuales fueron seleccionadas según su abundancia relativa en la Región de Coquimbo (Cornejo, 2015) y su identificación en el perfil de alimentación de *M. spinolai* en estudios anteriores (Rengifo, 2000; Canals et al., 2001; Chacón *et al.*, 2016). Las especies se agruparon en:

- Especies silvestres: ratón orejudo de Darwin (*Phyllotis darwini*), degú (*Octodon degus*), zorro culpeo (*Lycalopex culpaeus*), ratón de cola larga (*Oligoryzomys longicaudatus*), ratón oliváceo (*Abrothrix olivaceus*), ratón lanudo (*Abrothrix longipilis*) y conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*).
- Especies sinantrópicas: perro doméstico (*Canis lupus familiaris*), gato doméstico (*Felis catus*), cabra (*Capra hircus*), oveja (*Ovis aries*), caballo (*Equus caballus*), burro (*Equus asinus*), gallina doméstica (*Gallus domesticus*), ratón común (*Mus musculus*), rata negra (*Rattus rattus*).
- Especie humana (*Homo sapiens*).

Obtención de la muestra

Se obtuvieron al menos 0,2 mL de sangre de cada animal, los que se depositaron inmediatamente en tubos Eppendorf que contenían una cantidad equivalente de solución 6 M Guanidina-HCl 0,2 M EDTA (Ávila *et al.*, 1991) para su preservación hasta su posterior análisis en el laboratorio.

Extracción de ADN

Para extraer el ADN de las muestras obtenidas se utilizó el Kit *UltraClean® BloodSpin® DNA Isolation* (MO BIO) siguiendo el protocolo según instrucciones del fabricante.

Cuantificación ADN total

Para la cuantificación de ADN se utilizó el Kit *Qubit® dsDNA HS* (Invitrogen) siguiendo el protocolo según las instrucciones del fabricante, con lectura en el Fluorómetro *Qubit®*. Se registraron los resultados en ng/μL, para evidenciar la calidad del ADN de la muestra.

Análisis del perfil alimentario

Amplificación del gen citocromo b (*Cytb*)

Para diferenciar las especies que son fuentes de alimentación de *M. spinolai*, se amplificó un fragmento de 383 pares de bases del gen *Cytb* a partir de las muestras de ADN extraídas de controles y *M. spinolai* silvestres a través de PCR tiempo real utilizando los partidores Fw 5' CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3' y Rv 5' CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA 3' (Boakye *et al.*, 1999). La reacción estuvo compuesta por 2 μL de la muestra, 10 μL de *SensiFAST™ HRM* (Bioline), 1 μL (500 nM) de cada partidor y 6 μL de agua libre de nucleasas para un volumen final de reacción de 20 μL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Rotor-Gene® Q (2plex HRM Platform)*. El programa de amplificación constó de una incubación a 95°C por 3 minutos y 40 ciclos consistentes en una etapa de desnaturalización a 95°C por 5 segundos, una etapa de hibridación a 60°C por 10 segundos y una etapa de extensión a 72°C por 20 segundos. El registro de la fluorescencia emitida se realizó a 72°C al final de cada ciclo. Cada muestra se amplificó por duplicado.

Análisis de la curva de fusión de alta resolución (HRM)

Luego de la amplificación del gen *Cytb*, el análisis de la curva de fusión de los amplicones se llevó a cabo aumentando la temperatura de 72 °C a 92 °C, incrementando 0,1 °C por segundo, registrando los cambios en la fluorescencia con los cambios de temperatura (dF / dT).

El análisis del HRM se llevó a cabo utilizando el programa *Rotor Gene Q*, en el cual los genotipos se definieron seleccionando una muestra de cada especie estándar como un control

de referencia para identificar las muestras desconocidas. El programa le asignó un genotipo específico a cada muestra según la temperatura de fusión y la curva de disminución de la fluorescencia de cada muestra.

Análisis estadístico

Resolución del objetivo 1: Se calculó la proporción de cada una de las especies detectadas que formaron parte de la dieta de *M. spinolai*.

Resolución objetivo 2: Se comparó la dieta entre los distintos estadios y entre lugares de muestreo mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) utilizando el programa *GraphPad Prism 7*.

RESULTADOS

Amplificación del ADN de las fuentes de alimentación

En la amplificación previa de las muestras para detectar la presencia de ADN de las fuentes de alimentación en las muestras de *M. spinolai* silvestres, el 51,9% (759) resultó positiva a la amplificación, mientras que el 48,1% (703) no amplificaron, por lo cual fueron descartadas para el análisis HRM.

Según el estado de desarrollo, los estados Ninfa II y III presentaron la mayor proporción de individuos con muestras positivas. De las muestras negativas, el estado de desarrollo Ninfa I fue el que obtuvo una mayor proporción de individuos sin amplificación del gen *Cytb* (Tabla Nro. 1).

Tabla Nro. 1. Resultados de la amplificación del ADN de las fuentes de alimentación en las muestras de *M. spinolai*. Número y porcentaje de muestras positivas y negativas según estado de desarrollo.

Estado	Muestras Amplificadas			
	Positivas		Negativas	
Ninfa I	202	26,6%	374	53,2%
Ninfa II	226	29,8%	133	18,9%
Ninfa III	226	29,8%	134	19,1%
Ninfa IV	40	5,3%	32	4,6%
Ninfa V	22	2,9%	18	2,6%
Adulto	43	5,7%	12	1,7%
Total	759	100%	703	100%

Análisis *High Resolution Melting* (HRM)

Se observó un perfil HRM específico para cada especie analizada (Figura Nro. 1) dado por la forma de la curva de disminución de la fluorescencia con porcentajes de confianza (% C) entre 70% y 99,6 %. Aunque algunas especies exhibieron un valor similar en la temperatura de fusión (T_m), los perfiles de HRM en estas especies fueron claramente discriminados y reconocidos como diferentes genotipos. La T_m en las muestras presentó baja variabilidad intraespecie con una desviación estándar menor al 0,05% (Tabla Nro. 2).

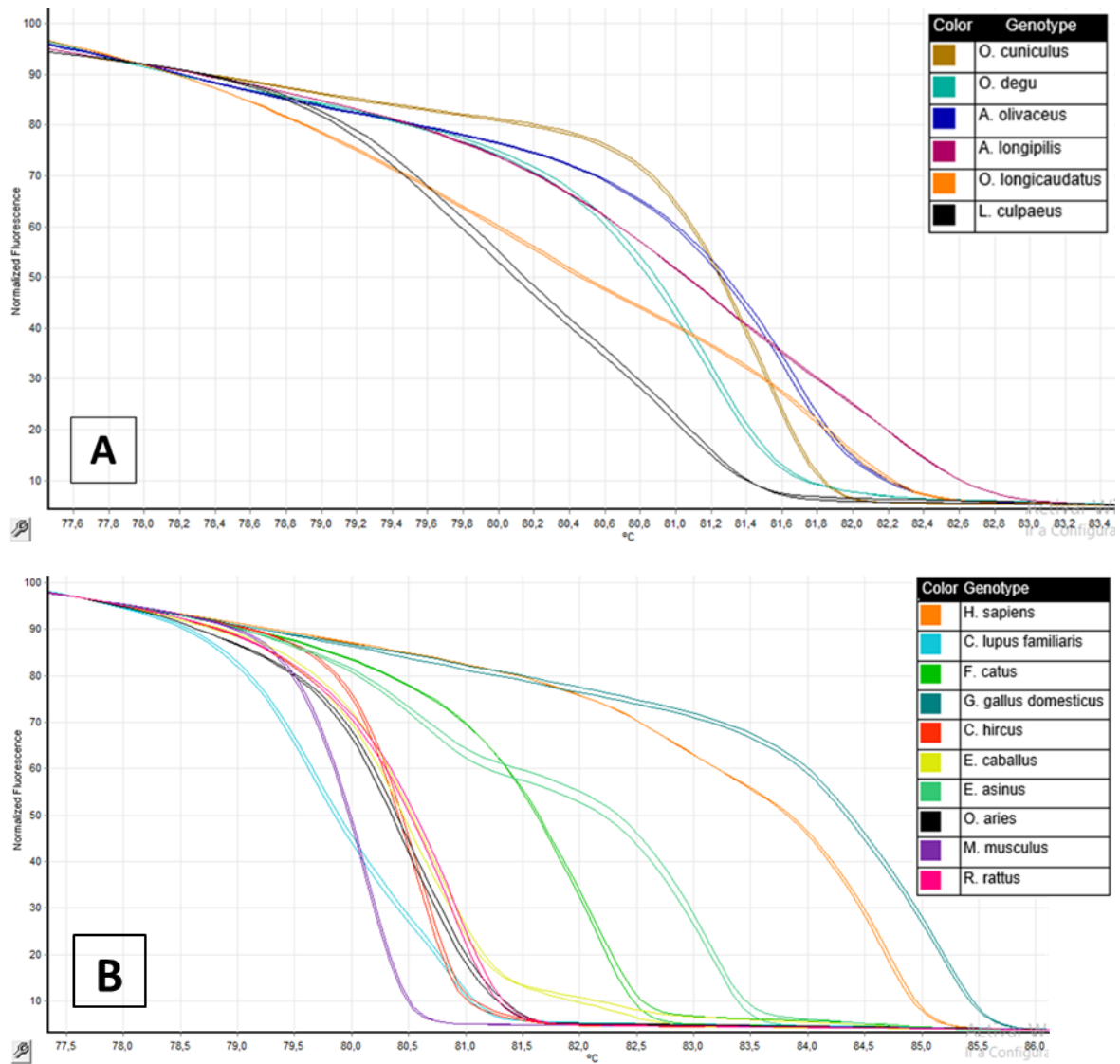


Figura Nro. 1. Perfil HRM de los controles de referencia. Curva de disminución de la fluorescencia con el aumento de la temperatura. A) Especies Silvestres. B) Especies Sinantrópicas y Humana.

Tabla Nro. 2. Temperatura de fusión (Tm) de los controles de referencia. 17 Especies estándar incluidas en este estudio con sus respectivas temperaturas de fusión. **SD:** desviación estándar.

Especie	Tm	SD
<i>H. sapiens</i>	84,85	0,03
<i>C. familiaris</i>	79,73	0,02
<i>F. catus</i>	82,24	0,04
<i>G. domesticus</i>	85,30	0,04
<i>C. hircus</i>	80,72	0,04
<i>E. caballus</i>	80,73	0,05
<i>E. asinus</i>	83,25	0,03
<i>O. aries</i>	80,55	0,04
<i>M. musculus</i>	80,21	0,03
<i>R. rattus</i>	80,98	0,03
<i>O. cuniculus</i>	81,44	0,05
<i>O. degus</i>	81,25	0,03
<i>P. darwini</i>	80,12	0,05
<i>A. olivaceus</i>	81,57	0,04
<i>A. longipilis</i>	81,18	0,05
<i>O. longicaudatus</i>	81,88	0,04
<i>L. culpaeus</i>	80,06	0,04

En este estudio se logró identificar muestras de *M. spinolai* que presentaron alimentación con 2 especies diferentes de vertebrados. En estos casos la curva de fusión presentó dos *peaks*: Tm1 y Tm2 (Figura Nro. 2) mientras que la curva de disminución de la fluorescencia presento dos caídas, para lo cual se modificó el área de normalización de cada caída de la curva para reconocer los genotipos por separado con su respectivo genotipo estándar.

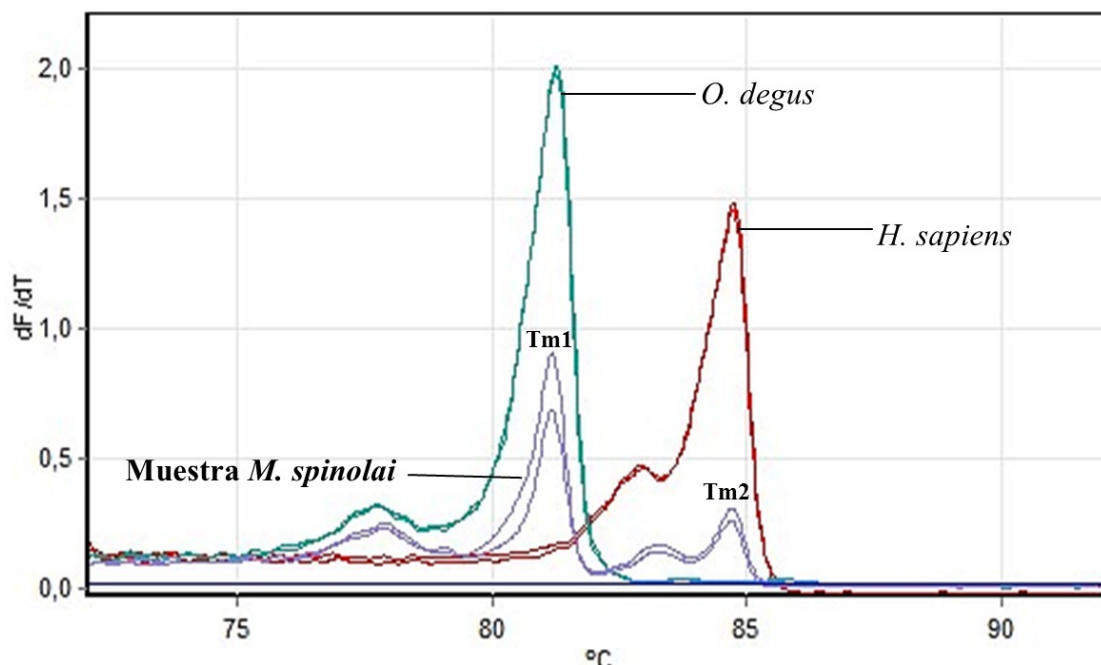


Figura Nro. 2. Curva de fusión de la muestra 575. Tm1: primer *peak* de la curva de fusión de la muestra correspondiente al genotipo *O. degus*, **Tm2:** segundo *peak* de la curva de fusión de la muestra correspondiente al genotipo *H. sapiens*.

Análisis del Perfil de Alimentación de *M. spinolai*

Del total de 759 muestras analizadas mediante la técnica HRM, se logró identificar el 73,4% (557) de las fuentes de alimentación, mientras que en un 26,6% (202) de éstas no se logró identificar la especie de vertebrado involucrado.

De las 557 muestras de *M. spinolai* con fuente de alimentación identificada, en el 90,3% (503) se identificó una sola especie, mientras que en el 9,7% (54) se identificaron dos especies diferentes como fuente de alimentación.

Resolución del objetivo específico 1: Del total de 557 muestras con fuentes de alimentación identificada se calculó la proporción de cada especie de vertebrado involucrado, obteniendo que las especies más consumidas correspondieron a *A. olivaceus* (17,4%), seguido de *O. degus* (16,1%) y *O. cuniculus* (12%) (Figura Nro. 3). Además, todas las especies de referencia fueron detectadas en, al menos cuatro individuos como fuentes de alimentación.

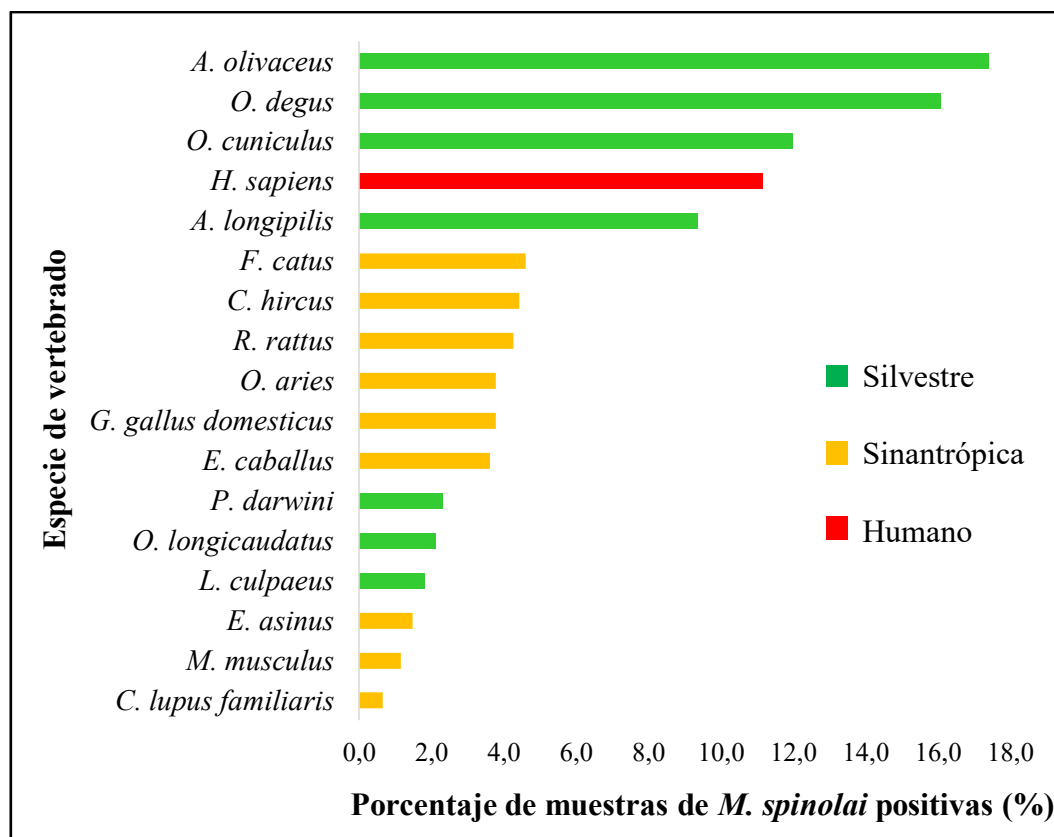


Figura Nro. 3. Perfil de Alimentación de *M. spinolai*. Porcentaje de muestras positivas a cada especie de vertebrado.

Del total de fuentes de alimentación identificadas se observó un predominio de especies silvestres (60,5%), seguido en orden decreciente por especies sinantrópicas, especie humana y alimentación mixta. Esta última agrupó las categorías: silvestre+humano, sinantrópica+humano, silvestre+sinantrópica (Tabla Nro. 3).

Tabla Nro. 3. Fuentes de alimentación de *M. spinolai* agrupadas según tipo de especie.

Número y porcentaje de muestras.

Tipo	Muestras	Porcentaje
Silvestre	337	60,5%
Sinantrópica	142	25,5%
Humana	44	7,9%
Mixta	34	6,1%
Total	557	100%

Resolución del objetivo específico 2: Se comparó la proporción de especies silvestres, sinantrópicas, humana o fuente mixta que fueron parte de la dieta de *M. spinolai* según estado de desarrollo. Esta proporción varió significativamente entre los distintos estados ($\chi^2=37,11$; $gl=15$; $p=0,0012$). Se observó en todos un predominio del tipo de fuente de origen silvestre, seguido en menor proporción del tipo sinantrópica. Los estadios ninfa I, ninfa II y adulto presentaron la mayor proporción de fuente humana en relación a los otros estadios, mientras que las ninfas I presentaron la menor proporción de fuentes de alimentación mixta (Figura Nro. 4).

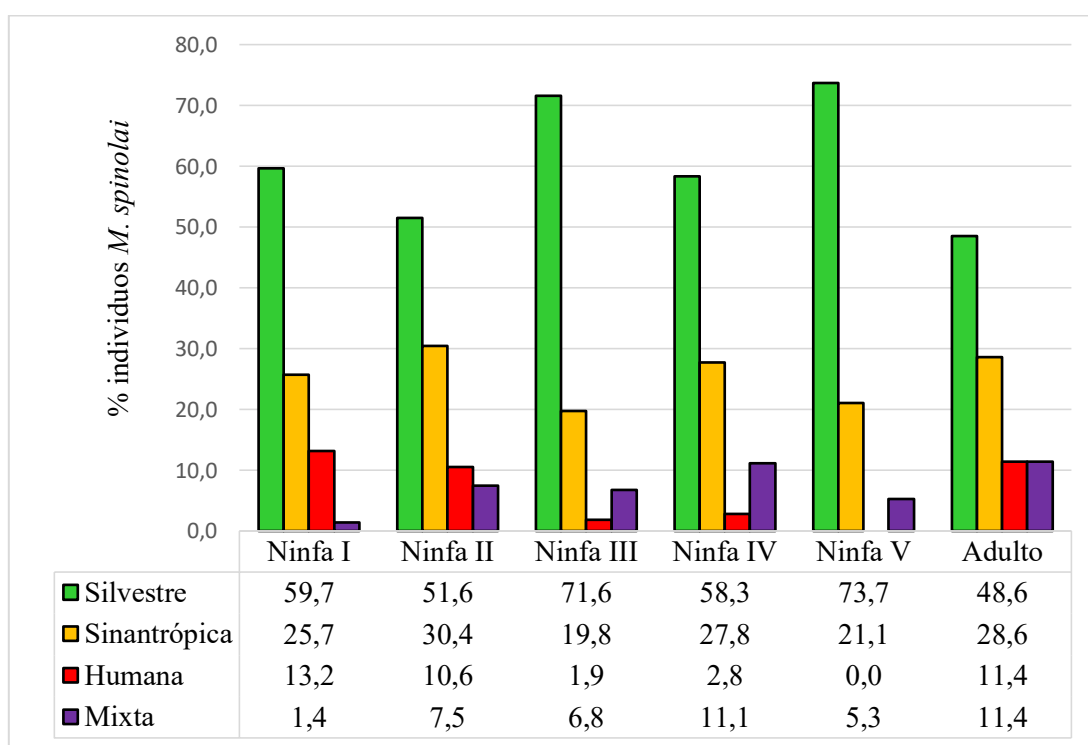


Figura Nro. 4. Tipo de fuentes de alimentación según estado de desarrollo. Porcentaje de individuos de *M. spinolai* positivos a cada tipo de fuente de alimentación según cada estado de desarrollo.

Además, la distribución del tipo de fuente de alimentación no fue homogénea entre los distintos lugares de muestreo, presentando diferencias significativas entre provincias ($\chi^2=22,93$; $gl=6$; $p=0,0008$). Se observó un predominio de las fuentes silvestres en las provincias de Limarí y Choapa, mientras que en la provincia de Elqui la alimentación en base

a especies sinantrópicas fue predominante. La mayor proporción de *M. spinolai* alimentadas con sangre humana se observó en Limarí (Figura Nro. 5).

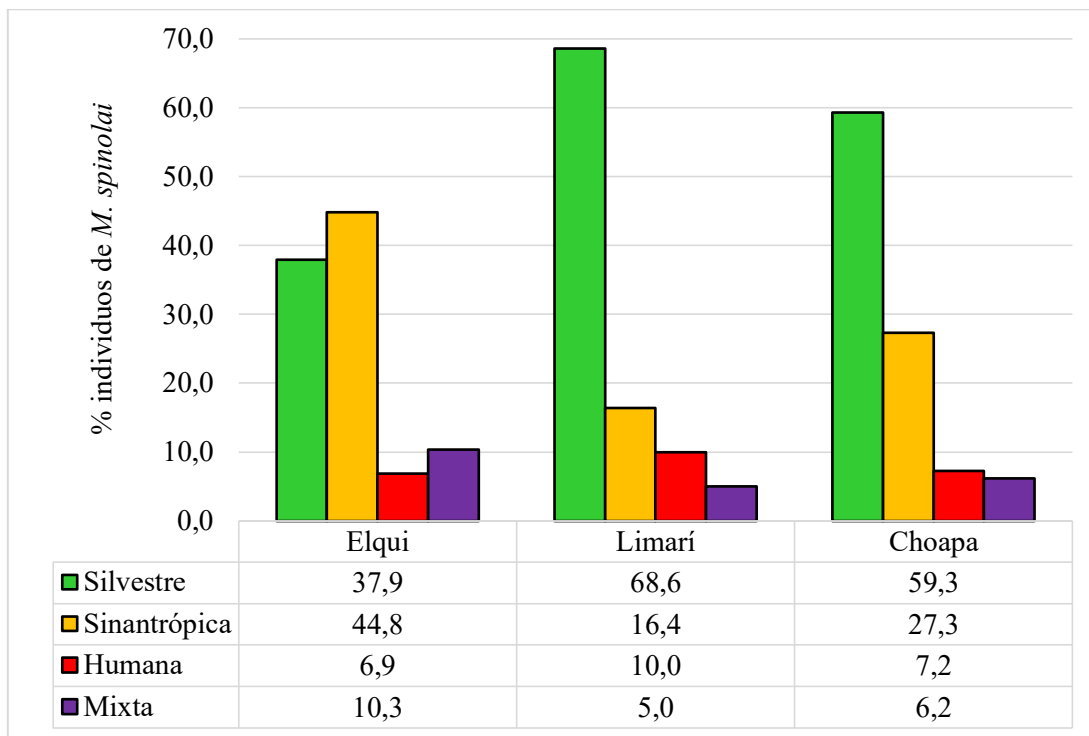


Figura Nro. 5. Tipo de fuentes de alimentación según lugar de muestreo. Porcentaje de individuos de *M. spinolai* positivos a cada tipo de fuente de alimentación según cada lugar de muestreo.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue determinar las fuentes de alimentación de *Mepraia spinolai*, vector silvestre de la enfermedad de Chagas, en la Región de Coquimbo, mediante análisis molecular. Para llevar a cabo este objetivo se realizó una amplificación previa de las muestras para detectar la presencia de ADN de las fuentes de alimentación. El 51,9% resultó positivas a la amplificación y el 48,1% no amplificaron. El alto porcentaje de muestras negativas obtenidas es consistente con estudios anteriores del perfil de alimentación de esta especie (Cruzat, 1997; Canals *et al.*, 2001; Rengifo, 2000; Chacón *et al.*, 2016).

Se ha descrito que *M. spinolai* puede sobrevivir a la inanición durante ≥ 2 meses (Acuña-Retamar *et al.*, 2009) lo que pudo afectar de alguna manera los presentes resultados. Esto porque todas las muestras provenían de ejemplares silvestres, en los cuales no se puede determinar el tiempo entre su última alimentación y la obtención de la muestra. El banco de ADN de las muestras de *M. spinolai* que se utilizó en este estudio pertenecía a individuos que murieron por inanición, según lo reportado por Barrera (2017), por lo que era esperable obtener una alta proporción de individuos negativos a la amplificación de su fuente de alimentación. Por otra parte, se descartó la ausencia y degradación del ADN así como la presencia de inhibidores como causal de falsos negativos al cuantificar el total de ADN por fluorometría (Brisco *et al.*, 2010; Sedlackova *et al.*, 2013) y amplificar un control endógeno (subunidad 18S del ADN ribosomal de *M. spinolai*) reportado previamente por Barrera (2017) para estas muestras. Según el estado de desarrollo, el mayor porcentaje de muestras positivas a la amplificación correspondieron a los estados Ninfa II (29,8%), III (29,8%) y I (26,6%), un factor a considerar es el mayor número de individuos capturados pertenecientes a estos estados, por lo que se esperaría encontrarlos en una mayor proporción en el total de muestras positivas a la amplificación. Según lo reportado por Canals y cols (1998), *M. spinolai* presenta fluctuaciones en la proporción de los estados de desarrollo en sus poblaciones, predominando las ninfas I, II y III, durante los meses de enero-mayo. El estado Ninfa I fue el que mostró el mayor número de individuos que no amplificaron en comparación al resto. Lo anterior podría estar relacionado con una eclosión reciente, donde el tiempo para alimentarse de hospederos fue mucho menor (Canals *et al.*, 1998). También puede deberse

a que el consumo de sangre es menor en este estado de desarrollo (Vallacís *et al.*, 2008; Mosquera *et al.*, 2016).

Mediante HRM se identificó el 73,4% de las fuentes de alimentación de las muestras que amplificaron. La no identificación del resto, se debería a la probable presencia de especies de vertebrados no incluidos en este estudio como controles de referencia (Cruzat, 1997; Rengifo, 2000; Canals *et al.*, 2001; Chacón *et al.*, 2016). Se ha descrito que sólo en el área del Valle del Elqui de la Región de Coquimbo la riqueza taxonómica global de vertebrados comprende 209 especies (Cepeda, 2009). Al momento de captura de los triatomíneos de este estudio, en la localidad de Matancilla se observó una alta cantidad de especímenes de *Rhinella arunco*, sapo de rulo, (Barrera 2017) por lo que esta especie pudo haber sido considerada en los controles de referencia de este estudio. Al respecto, se ha sugerido el uso de secuenciación del gen *Cyt b* para identificar las especies en función del grado de homología de la secuencia, cuando no han sido incluidas en los controles (Buitrago, 2016).

En cuanto al perfil de alimentación de *M. spinolai*, se obtuvo un predominio en primer lugar de *A. olivaceus* (ratón oliváceo), seguido de *O. degus* (degú) y *O. cuniculus* (conejo europeo) en orden decreciente. No existen registros en la literatura que describan al ratón oliváceo como principal fuente de alimentación de *M. spinolai*, por lo tanto, este estudio constituye el primer reporte del predominio de esta especie. La alta frecuencia de este roedor podría relacionarse con el aumento de la probabilidad de contacto en época de verano entre el roedor y el vector. Se ha descrito que el ratón oliváceo presenta mayor ámbito de hogar, durante la época de primavera-verano y presenta actividad continua en el matorral semiárido del centro-norte de Chile, donde su mayor actividad diurna es en verano (Muñoz-Pedrerros *et al.*, 1990), lo que podría aumentar la tasa de contacto con *M. spinolai* cuando comparten el mismo hábitat, ya que este triatómino es de hábitos diurnos (Canals *et al.*, 1997) y al igual que *A. olivaceus* presenta un mayor ámbito de hogar en verano (Botto-Mahan *et al.*, 2005b). Otra causa podría relacionarse con la abundancia del ratón oliváceo durante la época de captura de los triatóminos. En un estudio realizado durante el año 2005 sobre la abundancia de hospederos disponibles para *M. spinolai*, *A. olivaceus* fue la segunda especie de hospederos con mayor número de capturas durante los meses de verano en la Reserva Nacional Las Chinchillas, ubicada en la provincia de Choapa (Botto-Mahan *et al.*, 2005b). Si se considera

que *A. olivaceus* presenta fluctuaciones en su densidad tanto estacionales como multianuales (González y Murúa, 1985) y un ciclo de mayor abundancia cada cinco años (Murúa *et al.*, 1986) esta especie podría haber estado en un periodo de alta ciclicidad con mayor número de individuos disponibles como fuentes de alimentación para *M. spinolai*. Por otro lado, se ha reportado hasta un 42% de infección por *T. cruzi* en *A. olivaceus* (Rozas *et al.*, 2005), por lo que esta especie representa un importante reservorio tanto en el ciclo silvestre de la transmisión de *T. cruzi* como en el peridomicilio, ya que este roedor se puede desarrollar en ambientes agrícolas, siendo observado en sitios de la región Metropolitana junto con roedores sinantrópicos como *M. musculus* y *R. rattus* (Landaeta-Aqueveque *et al.*, 2007).

Por otra parte, el degú (*O. degus*) corresponde a una especie que ha sido tradicionalmente descrita como fuente de alimentación de *M. spinolai* (Frías *et al.*, 1995; Rengifo, 2000; Chacón, 2016). En este estudio se obtuvo un 16%, lo cual corresponde a un porcentaje mayor a lo obtenido por Rengifo (2000) con un 9,2% y menor a lo obtenido por Chacón y cols (2016) con un 22%. Probablemente esta alta frecuencia está relacionada con el uso del mismo hábitat descrito para los triatominos (Jiménez y Lorca, 1990) y a su abundancia en la Reserva Nacional Las Chinchillas donde *O. degus* fue la especie con mayor número de capturas en el periodo 2010-2014 Jiménez (2015). Por otra parte, se ha reportado hasta un 37% de infección por *T. cruzi* en poblaciones de *O. degus* (Botto-Mahan *et al.*, 2015), lo que demuestra la importancia de este roedor, como fuente de alimentación para los triatominos. Así, esta especie es además, un importante reservorio natural en el ciclo silvestre de transmisión de *T. cruzi* (Botto-Mahan *et al.*, 2012; Botto-Mahan *et al.*, 2010).

El conejo se ha descrito previamente como una especie importante en el perfil de alimentación de *M. spinolai*; sin embargo, la proporción encontrada fue más baja comparada con estudios previos, se obtuvo un 11,9% frente al 50% obtenido por Rengifo (2000), 33% obtenido por Canals y cols (2001) y 17% obtenido por Chacón y cols (2016). Lo anterior se debe a un efecto del tamaño muestral, el cual fue mayor en este estudio, por lo que al comparar el número de individuos, las muestras positivas a esta especie fue significativamente mayor (73), frente a las 45 muestras obtenidas por Rengifo (2000), 43 muestras por Canals y cols (2001) y 7 muestras por Chacón y cols (2016). La participación de esta especie exótica como fuente de alimentación puede deberse a que ambas especies,

conejo y vector comparten el mismo hábitat (Botto-Mahan *et al.*, 2005b; Botto-Mahan *et al.*, 2009); además, debido a las características de mamífero diurno y su conducta altricial, es decir, la mantención de crías al interior de madrigueras por largos periodos de tiempo, facilita el acceso de triatominos a los gazapos (Rengifo, 2000). Estos hallazgos de alta incidencia de sangre de conejo en el contenido intestinal de *M. spinolai* junto con reportes de hasta un 38% de infección por *T. cruzi* (Botto-Mahan *et al.*, 2009), hacen de esta especie un vertebrado de alto interés desde el punto de vista epidemiológico de la enfermedad de Chagas. Se ha observado que colonias de *M. spinolai* en laboratorio, alimentadas sobre conejo europeo mejoran sus parámetros poblacionales (fertilidad, sobrevivencia y peso promedio) al comparar con colonias alimentadas con otros roedores (Acuña, 2001), por lo que se ha propuesto que *M. spinolai* ha incorporado en su alimentación al conejo europeo seleccionándolo positivamente en los sectores donde coinciden en su distribución (Brañes, 2008).

Se obtuvo una baja participación de lauchón orejudo (*P. darwini*) con sólo un 2,3%, a diferencia de estudios anteriores donde representó la principal fuente de alimentación, con un 44,4% obtenido por Rengifo (2000) y 34,14% por Chacón y cols (2016). Es probable que las alternancias de la abundancia en el ciclo poblacional interanual, influyan en este hecho de la misma manera que para *A. olivaceus*. Según lo descrito por Lima y cols (2003) las poblaciones de lauchón orejudo fluctúan en el tiempo, donde el factor más relevante lo constituyen las precipitaciones, las cuales tendrían un papel importante para desencadenar la reproducción (Crespin y Lima, 2006). Dada la sequía persistente que presentó altos índices durante la segunda mitad del año 2014 (DMC, 2014a; DMC, 2014b), los triatominos podrían haber tenido menor oportunidad de alimentarse del lauchón orejudo si su población estaba mermada anterior al periodo de captura (Diciembre 2014-Febrero 2015).

La sangre humana en el perfil de alimentación de *M. spinolai* correspondió a un 11,1%, lo cual presenta diferencias con estudios previos. Fue mayor frente a lo obtenido por Canals y colaboradores (2001) con un 4,6% y Chacón y colaboradores (2016) donde ninguna muestra fue positiva a humano. También fue mayor frente a lo obtenido por Rengifo (2000), donde si bien se obtuvo una proporción mayor (16,4%), el número de individuos fue mucho menor, con solo 15 muestras positivas a humano frente a las 68 muestras de este estudio. Estas

diferencias podrían explicarse por la sensibilidad de la técnica, ya que en algunas muestras con alimentación mixta y un bajo *peak* en la curva de fusión se pudo determinar la presencia de sangre humana, por lo cual es posible que otras técnicas no fuesen lo suficientemente sensibles para detectar la pequeña cantidad de ADN en la muestra (Peña *et al.*, 2012). La participación de humano en la dieta de este vector debe explicarse por la intromisión y urbanización en sectores silvestres, por actividades laborales y recreacionales desarrolladas en su hábitat natural del triatomino y también por el control domiciliario de *T. infestans*. Con lo anterior, *M. spinolai* puede cobrar importancia epidemiológica como vector de la Enfermedad de Chagas, en la medida que su densidad poblacional aumente y que el hombre empiece a formar parte de su dieta habitual (Canals *et al.*, 1999; Canals *et al.*, 2000). Tomando en cuenta que los porcentajes de infección por *T. cruzi* son elevados (94,3%) según lo obtenido recientemente por Barrera (2017), el contacto de *M. spinolai* con el humano supone un riesgo de transmisión de *T. cruzi*. Este contacto podría aumentar cuando el vector doméstico (*T. infestans*) se elimina del domicilio, lo que permite que el vector silvestre pueda colonizar las viviendas humanas. Tal colonización ha sido reportada en Uruguay con el triatomino silvestre *Triatoma rubrovaria* (Salvatella *et al.*, 1991, 1994) y en Bolivia con *Rhodnius stali* (Matias *et al.*, 2003).

Del total de especies que formaron parte de la dieta de *M. spinolai* en este estudio se obtuvo un predominio de especies silvestres con un 61%, lo cual coincide con lo obtenido en estudios previos (Rengifo, 2000; Chacón *et al.*, 2016). Este predominio, sumado al hecho que *M. spinolai* presenta altos niveles de infección con *T. cruzi* (Botto-Mahan *et al.*, 2005a; Barrera, 2017) reafirma la importancia de este vector como responsable de la transmisión silvestre del parásito en las zonas semiáridas Mediterráneas de Chile. En distintos sectores de tales áreas se han detectado altos niveles de infección tanto en mamíferos silvestres como domésticos (Rozas *et al.*, 2007; Botto-Mahan *et al.*, 2008, 2010; Oda *et al.*, 2014; Jiménez *et al.*, 2015).

La mayor proporción de *M. spinolai* alimentadas con un solo hospedero (90,3%) es coincidente con lo señalado en estudios anteriores (Cruzat, 1997; Rengifo, 2000; Chacón *et al.*, 2016). Se reafirma que esta especie consume según la abundancia relativa de sus fuentes de alimentación, utilizando la estrategia de “sentarse y esperar” (Botto-Mahan *et al.*, 2005; Schofield, 1994), por ello, no busca otros hospederos si uno de ellos es abundante en el

hábitat. Desde este punto de vista es ecológicamente un animal oportunista, es decir, se alimenta preferentemente de la presa que presenta mayor oferta ambiental.

En cuanto al estado de desarrollo de *M. spinolai*, se obtuvieron diferencias significativas al comparar entre los estados. Si bien todos presentaron un predominio de fuentes de alimentación silvestre, las ninfas I, II y los adultos mostraron la mayor proporción de sangre humana con respecto a los otros estados. En el caso de las ninfas podría relacionarse con canibalismo y/o coprofagia a los estados adultos (Schaub, 1988), con lo cual podrían estar consumiendo ADN humano. En el caso del estado Adulto una posible causa podría ser la mayor probabilidad de contacto con humanos. Se ha descrito que las hembras adultas de *M. spinolai* caminan más, presentan mayor dispersión que el resto de los estados (Abrahan *et al.*, 2011) y que los machos adultos macrópteros presentan la mayor dispersión de vuelo (Frías-Laserre *et al.*, 2017). Estos autores recolectaron un mayor número de machos alados alimentados dentro de las viviendas humanas, mientras que en ambientes silvestres y peridomésticos los machos alados fueron menos frecuentes. Es probable que la eliminación de *T. infestans* en áreas urbanas, ha facilitado la entrada de *M. spinolai* a los ambientes domésticos ya que, como se ha demostrado en laboratorio, la presencia de *T. infestans* interfiere negativamente en la distribución de *M. spinolai* en un sistema experimental (Frías *et al.*, 1995).

Otro aspecto destacable es que las ninfas I mostraron la menor proporción de alimentación mixta. Como fue mencionado anteriormente, una posible explicación es la menor probabilidad de contacto con distintos hospederos al comparar con el resto de los estados, ya sea por menor tiempo de exposición a las fuentes de alimentación por su reciente eclosión (Canals *et al.*, 1998), como también porque presentan menor dispersión al caminar que el resto de los estados (Abrahan *et al.*, 2011).

También se detectaron diferencias significativas entre el tipo de fuente de alimentación de *M. spinolai* según lugar de muestreo. En las muestras de la provincia del Elqui se observó un predominio de alimentación con especies sinantrópicas. Al respecto, Valenzuela (2017) en Cochiguaz (provincia del Elqui) obtuvo una mayor frecuencia de caprinos infectados ($f = 0,76$) y la vez fue el lugar de muestreo con mayor altitud (1730 msnm). Esta variable (altitud) puede ser un factor que aumente la probabilidad de infección de los caprinos al tener más

posibilidades de contacto con focos silvestres de los insectos vectores. Por otra parte, Jaime (2017) en las localidades de Peralillo y Gualiguaica (Elqui) encontró los mayores niveles de infección en caninos domésticos con 59% y 55% respectivamente; ambas localidades se encuentran ubicadas hacia el norte de la Región de Coquimbo, donde se ha reportado una mayor probabilidad de presencia de vectores triatomínicos (Hernández *et al.*, 2013).

La provincia del Limarí mostró la mayor proporción de muestras positivas a sangre humana con respecto a las otras provincias. Esta positividad podría relacionarse con lo obtenido por Yefi (2016) donde describió que Tulahuén (Limarí) es la localidad que presenta mayor riesgo de transmisión de *T. cruzi* en el ciclo peridoméstico y doméstico del parásito. Se obtuvo un 17,5% de infección por *T. cruzi* en roedores capturados en el interior de viviendas rurales; en particular, de la especie *Rattus*, lo cual podría estar indicando que estos roedores son fuente de alimento para triatomínicos infectados. La existencia de fuentes de alimento en el domicilio tiene como consecuencia el posible establecimiento y mantención de colonias de vectores cercanas o en las viviendas y, por lo tanto, la participación de humanos en la dieta del vector y la transmisión de la enfermedad de Chagas.

CONCLUSIONES

Las fuentes de alimentación más frecuentes en este estudio correspondieron a especies de tipo silvestre con un 60,5%, siendo la especie más consumida el ratón oliváceo con un 17,4%.

Predominaron las especies silvestres en las provincias de Limarí y Choapa y en todos los estados de desarrollo de *M. spinolai*. En tanto, en la provincia de Elqui se presentó un predominio de fuentes de alimentación de tipo sinantrópica.

En este estudio se obtuvo un 11,1% de muestras positivas a humano, detectadas principalmente en la provincia del Limarí y en los estados de desarrollo de Ninfas I, II y Adulto.

En el total de individuos de *M. spinolai* se detectó más frecuentemente una sola fuente de alimentación (90,3%). De las muestras que presentaron dos fuentes de alimentación se encontró un bajo porcentaje de tipo mixta (6,1%), siendo las Ninfas I las que presentaron la menor proporción.

BIBLIOGRAFÍA

ABRAHAN, L.; GORLA, D.; CATALA, S. 2011. Dispersal of *Triatoma infestans* and other Triatominae species in the arid Chaco of Argentina: Flying, walking or passive carriage? The importance of walking females. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106(2):232-239.

ACUÑA, M.; BOTTO-MAHAN, C.; CANALS, M.; CORREA, J.; CATTAN, P.E. 2009. Comparative population dynamics of the bug *Mepraia spinolai*, a sylvatic vector of Chagas disease, in different hosts. *Med. Vet. Entomol.* 23:106–110.

APT, W.; REYES, H. 1986. Aspectos epidemiológicos de la Enfermedad de Chagas en Chile. Distribución geográfica, índices de infección en vectores y humanos. *Parasitol. día.* 10:94-101.

APT, W.; REYES, H. 1990. Algunos aspectos de la Enfermedad de Chagas en Latinoamérica. *Parasitol. día* 14:23-40.

APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ P.; NOEMÍ, I.; SAN MARTÍN, A.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I. 2008. Guías clínicas de la Enfermedad de Chagas. Parte I. Introducción y epidemiología. *Rev. Chil. Infectol.* 25:190-192.

APT, W.; ZULANTAY, I. 2011. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev. Med. Chile* 139:247-257.

ÁVILA, H.; SIGMAN, D.; COHEN, L.; MILLIKAN, R.; SIMPSON, L. 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48(2):211-222.

BACIGALUPO, A.; SEGURA, J.A; GARCIA, A.; HIDALGO, J.; GALUPPO, S.; CATTAN, P.E. 2006. Primer hallazgo de vectores de la enfermedad de Chagas asociados a matorrales silvestres en la Región Metropolitana, Chile. *Rev. Med. Chile* 134:1230-1236.

BARRERA, M.V. 2017. Relación de la carga parasitaria de *Trypanosoma cruzi* con peso y tamaño del vector silvestre *Mepraia spinolai*. Tesis para optar al Grado de Magíster en

Ciencias Animales y Veterinarias mención Medicina Preventiva Animal. Santiago, Chile. U. Chile, Facultad de Medicina Veterinaria. 31 p.

BOAKYE, D.A; TANJ, J.; TRUC, P.; MERRIWEATHER, A.; UNNASCH, T.R. 1999. Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. *Med. Vet. Entomol.* 13:282–287.

BOSENSO, M.F; GARCIA, L.S; BAUNAURE, F.; GASTELUM, E.M; GUTIERREZ, M.S. 2006. Identification in triatomine vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74:303–305.

BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ROZAS, M.; CATTAN, P.E; SOLARI, A. 2005a. DNA evidence of *Trypanosoma cruzi* in the Chilean wild vector *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100: 237-239.

BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN, P.E; ACUÑA, M. 2005b. 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.; SEPULVEDA, M.; ACUÑA, 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.

BOTTO-MAHAN, C. 2009. *Trypanosoma cruzi* induces life-history trait changes in the wild kissing bug *Mepraia spinolai*: implications for parasite transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9:505-510.

BOTTO-MAHAN, C.; BACIGALUPO, A.; CORREA, J.; ODA, E.; SOLARI, A. 2012. Field assessment of *Trypanosoma cruzi* infection and host survival in the native rodent *Octodon degus*. *Acta Trop.* 122:164-167.

BOTTO-MAHAN, C.; CORREA, J.P; BACIGALUPO, A.; CAMPOS-SOTO, R.; CATTAN, P.E; SOLARI, A. 2015. Ecología de los triatomos silvestres endémicos de Chile. *Parasitol. Latinoam.* 64:12-19.

BRAÑEZ, C. 2008. Estudio de la respuesta local y sistémica asociado al estrés provocado por la picada de vinchuca (*Mepraia spinolai*) en el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*). Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Facultad de Medicina Veterinaria. 79 p.

BRISCO, M.J.; LATHAM, S.; BARTLEY, P.A.; MORLEY, A.A. 2010. Incorporation of measurement of DNA integrity into qPCR assays. *Biotechniques* 49:893-7.

BUITRAGO, R.; DEPICKERE, S.; BOSSENO, M.F.; SIÑANI, E.; WALECKX, E.; SALAS, R.; ALIAGA, C., BRENIERE, S. 2012. Combination of cytochrome b heteroduplex-assay and sequencing for identification of triatomine blood meals. *Infect. Genet. Evol.* 12:21-27.

CAMPOS, R.; BOTTO-MAHAN, C.; ORTIZ, S.; ACUÑA, M.; CATTAN, P.E.; SOLARI, A. 2007. *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.; SOLIS, R.; VALDERAS, J.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.E. 1997. Preliminary studies on temperature selection and activity cycles *Triatoma infestans* and *T. spinolai* (Heteroptera: Reduviidae) Chilean vectors of Chagas disease. *J. Med. Entomol.* 34:11-17.

CANALS, M.; EHRENLD, M.; SOLIS, R.; CRUZAT, L.; PINOCHET, A.; TAPIA, C. 1998. Biología comparada de *Mepraia spinolai* en condiciones de laboratorio y terreno: cinco años de estudio. *Parasitol. día.* 22:(3-4)72-78.

CANALS, M.; SOLIS, R.; TAPIA, C.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.E. 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.

CANALS, M.; CRUZAT, L.; MOLINA, M.C; FERREIRA, A.; CATTAN, P. 2001. Blood host sources of *Mepraia spinolai* (Heteroptera: Reduviidae), wild vector of Chagas disease in Chile. J. Med. Entomol. 38:303-307.

CANALS, M.; GONZALEZ, C.; CANALS, L.; CANALS, A.; CACERES, D.; ALVARADO, S.; CATTAN, P.E., SAAVEDRA, M.; ZULANTAY, I., APT, W. 2017. ¿Qué dicen los números de la evolución temporal de la enfermedad de Chagas? Rev. Chil. Infectol. 34(2):120-127.

CEPEDA, J. 2009. Los sistemas naturales de la cuenca del Río Elqui (Región de Coquimbo, Chile) Vulnerabilidad y cambios del clima. Ediciones Universidad de La Serena. La Serena, Chile. 369 p.

CHACON, F.; BACIGALUPO, A.; QUIROGA, J.; FERREIRA, A.; CATTAN, P.E; RAMIREZ-TOLOZA, G. 2016. Feeding profile of *Mepraia spinolai*, a sylvatic vector of Chagas disease in Chile. Acta Trop. 162:171-173

CHATEIGNER-BOUTIN, A.L; SMALL, I. 2007. A rapid high-throughput method for the detection and quantification of RNA editing based on high-resolution melting of amplicons. Nucleic. Acids. Res. 35:114.

CHILE. MINISTERIO DE SALUD. 1995. Circular N ° 4F/ 53 Norma sobre exámenes microbiológicos obligatorios a realizar a toda la sangre donada para transfusiones y otros aspectos relacionaos con la seguridad microbiológica de la sangre. 19 diciembre 1995.

CHILE. MINISTERIO DE SALUD. 2008. Circular N° 4 Instruye a todos los Bancos de Sangre de la red asistencial de salud pesquisar la presencia del parásito *T. cruzi* que provoca la Enfermedad de Chagas. 30 mayo 2008.

CHOW, E.; WIRTZ, R.; SCOTT, T. 1993. Identification of bloodmeals in *Aedes aegypti* flies (Diptera Simuliidae). J. Med. Entomol. 28:527-532.

CRESPIN, L.; LIMA, M. 2006. Supervivencia adulta y dinámica poblacional del lauchón orejudo *Phyllotis darwini* en Chile central. Rev. Chil. Hist. Nat. 79(3):295-308.

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.

DMC. DIRECCION METEREOLÓGICA DE CHILE. 2014a. Monitoreo de sequía meteorológica. [en línea]. Boletín Climatológico Mensual Julio 2014. 3(7):10. <<https://climatologia.meteochile.gob.cl/application/publicaciones/boletinClimatologicoMensual/2014/7>> [consulta: 13 -06- 2018]

DMC. DIRECCION METEREOLÓGICA DE CHILE. 2014b. Monitoreo de sequía meteorológica. [en línea]. Boletín Climatológico Mensual Agosto 2014. 3(8):8. <<https://climatologia.meteochile.gob.cl/application/publicaciones/boletinClimatologicoMensual/2014/8>> [consulta: 13 -06- 2018]

FRIAS-LASSERRE, D.; SOLARI, A.; GONZALEZ, 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. día 19:195.

FRIAS-LASSERRE, D. 2010. A New species and karyotype variation in the bordering distribution of *Mepraia spinolai* and *Mepraia gajardoi* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its parapatric model of speciation. Neotrop. Entomol. 39:572-583.

FRIAS-LASSERRE, D.; GONZALEZ, C.; REYES, C.; BLANCO, D.; OLIVEIRA, J.; CANALAS, M.; ARISTEU, J. 2017. Wing polymorphism and *Trypanosoma cruzi* infection in wild, peridomestic, and domestic collections of *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae) from Chile. J. Med. Entomol. 54(4):1061-1066.

GONZÁLEZ, L.A; MURÚA, R.E. 1985. Características del período reproductivo de tres especies de roedores cricétidos del bosque higrófilo templado. An. Mus. Hist. Nat. Valparaíso 16:87-99.

- GÜRTLER, R.E.; DIOTAIUTI, L.; KITRON, U.** 2008. Commentary: Chagas disease: 100 years since discovery and lessons for the future. *Int. J. Epidemiol.* 37(4):698-701.
- GURTLER, R.; COHEN, J.; CECERE, M.; CHUIT, R.** 1997. Shifting Host Choices of the Vector of Chagas Disease, *Triatoma Infestans*, in Relation to the Availability of Host in Houses in North-West Argentina. *J. Appl. Ecol.* 34:699-715.
- HERNÁNDEZ, J; NÚÑEZ, I; BACIGALUPO, A; CATTAN, P.** 2013. Modeling the spatial distribution of Chagas disease vectors using environmental variables and people's knowledge. *Int. J. Health Geogr.* 12-29.
- HUNTER, F.; BAYLY, R.** 1991. ELISA for identification of bloodmeal source in black (Diptera: Simuliidae). *J. Med. Entomol.* 28(4):527-32.
- IRWIN D.M; KOCHER T.D; WILSON, A.C.** 1991. Evolution of the cytochrome b gene in mammals. *J. Molec. Evol.* 32:128-144.
- ISPCH. INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE.** 2014. Vigilancia de Enfermedad de Chagas 2005 – 2013: Componente vectorial. *Boletín ISP* 4(6):1-16.
- JIMENEZ, C.; FORTURBEL, F.E.; ODA, E.; RAMIREZ, P.; BOTTO-MAHAN, C.** 2015. Parasitic infection alters rodent movement in a semiarid ecosystem. *Mamm. Biol.* 80:255-259.
- JIMENEZ, J.; LORCA, M.** 1990. American Trypanosomiasis in wild vertebrates and its relation to the vector *Triatoma spinolai*. *Arch. Med. Vet.* 22:179-183.
- JIRON, L.; ZELEDON, R.** 1982. Feeding preferences in 3 species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in experimental conditions. *Rev. Biol. Trop.* 30:151-159.
- KIERSZENBAUM, F.; IVANYI, J.; BUDZKO, D.B.** 1976. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol.* 30(1): 1-6.
- KOLLIEN, A.; SCHAUB, G.** 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol. Today* 16(9):381-387.

- LANDAETA-AQUEVEQUE, C.A.; ROBLES, M.D; CATTAN, P.E.** 2007. Helminthofauna del roedor *Abrothrix olivaceus* (Sigmodontinae) en áreas sub-urbanas de Santiago de Chile. *Parasitol. Latinoam.* 62:134-141
- LIMA, M.; MARQUET, P.; JAKSIC, F.M.** 1999. El Niño events, precipitation patterns, and rodent outbreaks are statistically associated in semiarid Chile. *Ecography* 22:13-8.
- LIMA, M.; STENSETH, N.C; LEIRS, H.; JAKSIC, F.M.** 2003. Population dynamics of small mammals in semiarid regions: a comparative study of within-year demographic variability in two rodent species. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 270:1997-2007.
- LEE, J.H; HASSAN, H.; HILL, G.; CUPP, E.W; HIGAZI, T.B.** 2002. Identification of mosquito avian-derived blood meals by polymerase chain reaction-heteroduplex analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66:599-604.
- LENT, H.; WYGODZINSKY, P.** 1979. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163:123-520.
- MACHADO, C.M; MARTINS, T.C; COLTURATO, I.; LEITE, M.S.; SIMIONE, A.J; SOUZA, M.P; MAUAD, M.A; COLTURATO, V.R.** 2009. Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a Brazilian HSCT center. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 51(6):309-324.
- MARCILI, A.; LIMA, L.; VALENTE, V.; VALENTE, S.; BATISTA, J.; JUNQUEIRA, A.; SOUZA, A.; DA ROSA, J.; CAMPANER, M.; LEWIS, M.; LLEWELLYN, M.; MILES, M.; TEIXERA, M.** 2009. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIc: New hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect. Genet. Evol.* 9:1265-1274.
- MINSAL. MINISTERIO DE SALUD.** 2011. Guía Clínica “Guía de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas”. Santiago, Chile. 38p
- MINSAL. MINISTERIO DE SALUD.** 2014. Norma general técnica de control y prevención nacional de la enfermedad de Chagas. Santiago, Chile. 98pp.

MORETTI, E.; BASSO, B.; MOYA, P. 2007. Manejo de la transmisión congénita. Estado actual y perspectivas. **In:** La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. Buenos Aires, Argentina. Junio 2007. Organización Panamericana de la Salud - Fundación Mundo. pp. 167-178.

MOTA, J.; CHACON, J.; GUTIERREZ-CABRERA, A.; SANCHEZ-CORDERON, V.; WIRTZ, R.; ORDOÑEZ, R.; PANZERA, F.; RAMSEY, J. 2007. Identification of blood meal source and infection with *Trypanosoma cruzi* of Chagas disease vectors using a multiplex cytochrome b polimerase chain reaction assay. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7:617-627.

MOSQUERA, K.; VILLACIS, A.; GRIJALVA, M. 2016. Life Cycle, Feeding, and Defecation Patterns of *Panstrongylus chinai* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Under Laboratory Conditions. *J. Med. Entomol.* 53(4):776-781.

MUÑOZ-PEDREDEROS, A.; MURUA, R.; GONZALEZ, L. 1990. Nicho ecológico de micromamíferos en un agroecosistema forestal de Chile central. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 63:267-277.

MURUA, R.E.; GONZALEZ, L.A. 1986. Regulation of numbers in two Neotropical rodent species in southern Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 59(2):193-200.

NATTERO, J.; RODRIGUEZ, C.; CROCCO, L. 2011. Influence of the quality and quantity of blood ingested on reproductive parameters and life-span in *Triatoma infestans* (Klug). *Acta Trop.* 97:183-187.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD. Guía para vigilancia, prevención, control y manejo clínico de la enfermedad de Chagas aguda transmitida por alimentos. Rio de Janeiro, 2009. 70 p.

ODA, E.; SOLARI, A.; BOTTO-MAHAN, C. 2014. Effects of mammal host diversity and density in the infection level of a sylvatic kissing bug. *Med. Vet. Entomol.* 28:384-390.

PEÑA, V.; FERNANDEZ, G.; GOMEZ-PALACIO, A.; MEJIA-JARAMILLO, A.; CANTILLO, O.; TRIANA-CHAVEZ, O. 2012. High-Resolution Melting (HRM) of the

Cytochrome B Gene: A Powerful Approach to Identify Blood-Meal Sources in Chagas Disease Vectors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6(2): e1530.

PINEDA, V.; MONTALVO, E.; ALVAREZ, D.; SANTAMARIA A.; CALZADA, J. 2008. Feeding sources and trypanosome infection index of *Rhodnius pallescens* in a Chagas disease endemic area of Amador County, Panama. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 50:113-116.

PIZARRO, J.; LUCERO, D.; STEVENS, L. 2007. A method for the identification of guinea pig blood meal in the Chagas disease vector, *Triatoma infestans*. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 6:1-28.

PIZARRO, J.; STEVENS, L. 2008. A new method for forensic DNA analysis of the blood meal in Chagas disease vectors demonstrated using *Triatoma infestans* from Chuquisaca, Bolivia. *PLoS One* 3:3585.

RENGIFO, A. 2000. Preferencias alimentarias específicas de *Mepraia spinolai* por vertebrados frecuentes en su hábitat. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad Medicina Veterinaria. 69 p.

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(3):517-519.

SALVATELLA, R.; ROSA, R.; BASMADJIAN, Y. PUIME A.; CALEGARI, L.; GUERRERO, J.; MARTINEZ, M.; MENDARO, G.; BRIANO, D.; MONTERO, C.; WISNIVESKY-COLLI, C. 1995. Ecology of *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Triatominae) in wild and peridomestic environments of Uruguay. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90:325-328.

SASAKI, H.; ROSALES, R.; TABARU, Y. 2003. Host feeding profiles of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in Guatemala (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Med. Entomol. Zool.* 54:283–289.

- SCHAUB, G.A.** 1998. Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between vectors of Chagas disease. *Acta Trop.* 45:11-19.
- SCHOFIELD, C.** 1994. Triatominae: biología y control. Eurocommunica Publications. West Sussex, UK. 80 pp.
- SEDLACKOVA, T.; REPISKA, G.; CELEC, P.; SZEMES, T.; MINARIK, G.** 2013. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biol. Proced. Online* 5: 5.
- SOLARI, A.** 2011. Past and present of Chagas disease in Northern Chile. *Chungará. Rev. Antropol. Chil.* 43(2):315-322.
- TORRES, M.** 2010. Control de enfermedad de Chagas en Bancos de sangre. **In:** Simposio Internacional Bicentenario Chile XIII Jornadas anuales de parasitología. Santiago, Chile. 18-19 Noviembre 2010. U. Chile, Facultad Medicina - Sociedad Chilena de Parasitología. P-24.
- TOWNZEN, J.S.; BROWER, A.; JUDD, D.D.** 2008. Identification of Mosquito Blood meals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. *Med. Vet. Entomol.* 22:386-393.
- TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M.** 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* 31:472-481.
- VILLACIS, A.; ARCOS-TERAN, L.; GRIJALVA, M.** 2008. Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León 1958) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103(7):690-695.
- VOSEN, R.H.; ATEN, E.; ROOS, A.; DEN DUNNEN, J.T.** 2009. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum. Mutat.* 30:860-866.
- WITWER, C.T.** 2009. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum. Mutat.* 30:857-859.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2018. Chagas disease (American trypanosomiasis) [en línea] <[http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))> [consulta 22-05-2018]


ZULANTAY I., APT W., VALENCIA C., TORRES A., SAAVEDRA M., RODRÍGUEZ J., SANDOVAL L., MARTÍNEZ G., THIEMEL P., SEPÚLVEDA E. 2011. Detection of *Trypanosoma cruzi* in untreated chronic chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. J. Antimicrob. Chemother. 66:2224-2226.

ANEXOS

ANEXO NRO. 1: PLANIFICACIÓN

Mes	1				2				3				4				5				6			
Actividades/ semanas	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Redacción del proyecto																								
Obtención muestras control																								
Extracción ADN																								
Cuantificación ADN																								
PCR tiempo real																								
Análisis HRM																								
Análisis estadístico																								
Presentación Avance Tesis																								
Correcciones																								
Presentación Final																								

ANEXO NRO. 2: DECLARACIÓN DE ÉTICA



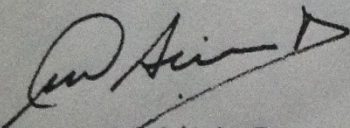
UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Comité de Bioética Animal

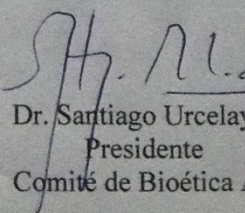
Santiago, 4 de octubre de 2013


CERTIFICADO

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del del Proyecto Fondecyt Regular 2014 titulado “**Epidemiological relevance of the parasite load in vectors and mammalian reservoirs of Chagas disease regarding diet and foci characteristics of triatomines**”, cuyo investigador principal es el Dr. **Pedro E. Cattán**, el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile certifica que éstos Protocolos satisfacen lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y no contraviene la legislación chilena vigente sobre la materia.

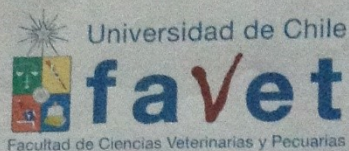
A este respecto el Comité estima que el estudio propuesto usa animales silvestres y domésticos en calidad y cantidad mínima necesaria para obtener resultados válidos, realiza intervenciones médico veterinarias autorizadas, bajo consentimiento informado, que garantizan la exclusión de sufrimiento innecesario a los animales y da cuenta apropiada de los criterios de punto final requeridos para el efecto.


Dr. José Luis Arias B.
Director
Comité de Bioética Animal


Dr. Santiago Urcelay
Presidente
Comité de Bioética Animal



ANEXO NRO. 3: DECLARACIÓN DE BIOSEGURIDAD



CERTIFICADO N° 29

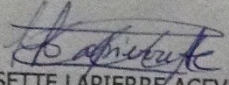
Santiago 07 de Octubre de 2013

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, revisó el proyecto titulado: "Epidemiological relevance of the parasite load in vectors and mammalian reservoirs of Chagas disease regarding diet and foci characteristics of triatomines" el cual será presentado para su exanimación en el concurso FONDECYT Regular 2014 de CONICYT, y cuyo Investigador Responsable es el Dr. Pedro E Cattán.

En el proyecto se estipulan las siguientes medidas de Bioseguridad:

- 1.- El Personal a cargo de la toma de muestra está entrenado y calificado para realizar dicho trabajo.
- 2.- Uso de vestimenta adecuada y desinfectantes adecuados para realizar el trabajo en terreno y en el laboratorio.
- 2.- Uso de campanas de flujo para el trabajo con material biológico.
- 3.- Los desechos biológicos serán autoclavados para posteriormente ser eliminados a la basura común.

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

