



**GENOTIPIFICACIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI* MEDIANTE
PCR EN TIEMPO REAL EN SANGRE Y DEYECCIONES DE
TRIATOMA INFESTANS ALIMENTADOS EN PACIENTES
CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

María José Manneschi Salas

Julio, 2020

Director de Tesis: Carezza Verónica Botto Mahan

Co-directoras de Tesis: Inés Zulantay Alfaro y Alena Mayo Iñiguez

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

María José Manneschi Salas

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Carezza Botto

.....

Co-Director de Tesis:

Dr. Inés Zulantay

.....

Co-Director de Tesis:

Dr. Alena Mayo Iñiguez

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Aldo Solari

.....

Dr. David Véliz

.....

RESUMEN BIOGRAFICO



Nací el 31 de mayo de 1984 en Santiago, donde realicé mis estudios secundarios. En el 2003 ingresé a la Universidad de Chile y el 2008 obtuve la Licenciatura en Antropología con mención en Antropología Física. Desde el 2004 en adelante me dediqué a la práctica deportiva del montañismo en la zona central de Chile por varios años. El año 2015 realicé el Diplomado de Fotografía Aplicada Digital y Análoga en la Universidad Católica de Valparaíso. Actualmente resido en la ciudad de Viña del Mar. Como profesional me he desempeñado mayoritariamente en la consultoría ambiental y arqueológica en prospecciones y excavaciones desde hace 11 años, siendo mi especialidad la recuperación en terreno de restos humanos y análisis bioantropológico en laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Para todas aquellas personas del ámbito académico y laboral, que a pesar de los tiempos, las vanguardias, tendencias y los tan mentados “ismos” (feminismos, animalismos, anticolonialismos, oportunismos, etc...), no abandonan la esencia de ser maestros y maestras. Quisiera agradecer a Carezza Botto, Inés Zulantay y Alena Mayo Iñiguez. A Daniela Carrasco por su ayuda en laboratorio y a todas aquellas personas que participan en el laboratorio de Ecología Evolutiva de la Facultad de Ciencias. A Iván Cáceres Roque, José Miguel Ramírez y Aryel Pacheco por sus consejos. A mi papá por su apoyo en mis estudios y a mis amistades por haber creído en mí y mis capacidades. También quiera agradecer a los integrantes de la comisión por sus comentarios. Todo el material, reactivos y equipamiento de laboratorio requeridos para la ejecución de esta tesis fueron proveídos por el Proyecto Fondecyt 1161485 y parcialmente por el Proyecto EULAC Health T020108 (Conicyt Fonis-Fondef), de los cuales Inés Zulantay es investigadora.

Índice de Materias

Portada.....	i
Resumen Biográfico	ii
Agradecimientos	iii
Índice de Materias	iv
Lista de Tablas	v
Lista de Figuras	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de cantidades y símbolos de unidades de medida	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
Introducción	1
1. Antecedentes Teóricos	1
2. Hipótesis de Trabajo	11
3. Objetivo General.....	11
4. Objetivos Específicos	12
Materiales y Métodos	14
1. Grupo de estudio	14
2. Muestras	16
2.1 Xenodiagnóstico	16
2.2 Muestras biológicas Xenodiagnóstico	16
2.3 Extracción de ADN Xenodiagnóstico	17
2.4 Obtención y purificación de ADN de muestras de sangre para qPCR	17
3. PCR en Tiempo Real	18
3.1 Curva estándar y sistema de detección SYBR Green	18
3.2 Cuantificación de <i>T. cruzi</i>	18
3.3 Genotipificación por PCR cuantitativo	19
3.4 Algoritmo de identificación de DTUs de <i>T. cruzi</i>	20

4. Análisis Estadístico	21
Resultados	22
1. Estructura poblacional de la muestra	22
2. Carga parasitaria de las muestras biológicas	22
3. Genotipificación en muestras de XD y Sangre periférica	23
Discusión	26
Conclusiones	37
Bibliografía	38

Lista de Tablas

Tabla 1. Grupo de estudio de pacientes con enfermedad de Chagas crónico con Xenodiagnóstico 30 y/o 60 y/o 90 días positivo, procedentes de la Región de Coquimbo. Para el XD, (+) presenta carga parasitaria en una caja, 2 (+) en dos cajas y (-) sin carga parasitaria <i>T. cruzi</i>	15
Tabla 2. Cepas de referencia representativas de los DTU de <i>T. cruzi</i> más frecuentes en Chile utilizados en la evaluación de la performance analítica de los ensayos de genotipificación mediante PCR	17
Tabla 3. Equivalencias en distintas unidades de masa de ADN de <i>T. cruzi</i> para una determinada concentración de parásitos.....	18
Tabla 4. Secuencias y concentraciones de los <i>primers</i> utilizados en ensayos de genotipificación mediante qPCR de las Unidades Discretas de Tipificación (DTUs)	20

Lista de Figuras

Figura 1. Las formas de <i>T. cruzi</i> . A) Epimastigote en tinción Giemsa. B) Tripomastigote en en sangre con tinción Giemsa. C) Nido de Amastigotes en miocitos de corazón en paciente con ECh crónico, tinción hematoxilina y eosina. Figura tomada de Bern <i>et al.</i> (2019).....	3
Figura 2. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> . Figura tomada del Center for Disease Control and Prevention (https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html).	4
Figura 3. Representación geográfica aproximada de la distribución de los DTU de <i>T. cruzi</i> , en ciclos de transmisión doméstica y selvática. Figura tomada de Zingales <i>et al.</i> (2012).....	7
Figura 4. Mapa de Chile con la representación de los biomas de Chile en colores más la distribución de especies de vertebrados afectados por <i>Tripanosomatideos</i> . Los vertebrados	

nativos e introducidos infectados con *Trypanosoma cruzi* están representados en negro. En líneas achuradas el área de distribución de las especies de triatominos que hay en Chile. Figura tomada de Correa *et al.* (2020). 10

Figura 5. Frecuencias obtenidas por cada DTU para Xenodiagnóstico y sangre periférica en presencia simple y mixta 25

Lista de cantidades y símbolo de las unidades de medida

Longitud	Metro	m, mm, μm , nm, etc.
Volumen	Litro	L, ml, μl , etc.
Tiempo	Hora	h, min, s, ms, μs
Masa	Kilogramo	Kg, g, mg, μg , ng, fg, etc
Concentración	mol/l	M, mM, μM , etc.
Masa molecular	Daltons	Da, kDa
Tamaño molecular	Pares de bases	pb, Kpb
Temperatura	Grados Celsius	$^{\circ}\text{C}$
Frecuencia	Revoluciones por minuto	rpm

Lista de Abreviaturas

A.C.	Antes de Cristo
D.C.	Después de Cristo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECh	Enfermedad de Chagas
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
IFI IgG	Inmunofluorescencia indirecta para detección de anticuerpos IgG
DTU	Unidades discretas de tipificación
Par.eq/ml	Parásitos equivalentes por mililitro
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real o cuantitativa
®	Marca comercial registrada
Tm	Temperatura de desnaturación térmica
UV	Luz ultravioleta
XD	Xenodiagnóstico

RESUMEN

La enfermedad de Chagas (ECh) es una zoonosis vectorial originaria del continente americano, causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, y transmitida por numerosas especies de insectos hematófagos de la familia Triatominae. Ya que se trata de un parásito complejo, un aspecto relevante ha sido la identificación de los diversos genotipos de *T. cruzi* llamados DTU (*Discrete Typing Units*) que van desde el TcI al TcVI. En Chile los DTUs detectados en pacientes humanos son TcI, TcII, TcV y TcVI entre individuos infectados. Identificar los DTUs ha adquirido importancia clínica, pues diferentes genotipos podrían causar distintas patologías, circular en diferentes localidades y ciclos de transmisión y presentar diferente sensibilidad a fármacos tripanocidas. En esta tesis, se amplificaron mediante qPCR los DTUs de *T. cruzi* circulantes en sangre periférica y en Xenodiagnóstico (XD), una técnica que utilizó *Triatoma infestans* para amplificar el parásito de 14 pacientes crónicos con ECh de las Provincias de Choapa y Limarí, Región de Coquimbo, Chile. Como resultado fue posible determinar que el XD presentó mayor cantidad de casos positivos en comparación a la muestra de sangre periférica. En el total de los casos se detectó 64,28% infección simple y 35,72% mixtas, más diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia del DTU TcV. Al utilizar XD se pudo detectar como *T. infestans* amplifica tiene afinidad un DTU que por sobre otros, probablemente debido a un proceso de co-evolución.

ABSTRACT

Chagas disease (ECh) is a vecto- borne zoonosis native to the Americas caused by the parasitic protozoan *Trypanosoma cruzi*, and numerous species of hematophagous insects of the Triatominae family. As a complex parasite, a relevant aspect is the identification of the various genotypes of *T. cruzi* called DTU (Discrete Typing Units) ranging from TcI to TcVI. In Chile, the DTU identified in infected human patients are TcI, TcII, TcV, and TcVI. Identifying DTUs has gained clinical importance since different genotypes could cause different pathologies, circulate in different locations and transmission cycles and present different sensitivity to trypanocidal drugs. In this thesis, the circulating *T. cruzi* DTUs in peripheral blood were amplified by qPCR and in Xenodiagnostic (XD), a technique that used *Triatoma infestans* to amplify the parasite of 14 chronic patients with ECh from the provinces of Choapa and Limarí, Region of Coquimbo, Chile. As a result, it was possible to determine that the XD presented a greater number of positive cases compared to the peripheral blood sample. In the total of cases, 64.28% simple and 35.72% mixed infections were detected, plus statistically significant differences in the frequency of TcV DTU. When using XD, it could be detected that *T. infestans* have an affinity for one DTU over others, probably due to a co-evolution process.

INTRODUCCION

1. Antecedentes Teóricos

La enfermedad de Chagas (ECh) es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y transmitida por insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae), conocidos como “vinchucas”, que cumplen el rol de vectores biológicos de la transmisión. Se considera la enfermedad tropical desatendida más relevante del continente americano, donde la gran mayoría de los infectados provienen de sectores rurales. La ECh está presente en 21 países, desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina en Sudamérica, exceptuando las islas caribeñas, afectando principalmente a países de América Latina (OMS 2020). Se estima que en el mundo hay unas 6 a 7 millones de personas infectadas, hacia el 2010 se produjeron unas 14 mil muertes anuales y 70 millones de personas están en riesgo de contraer la infección (OPS 2016, OMS 2020). En Chile, la ECh se extiende desde la Región de Arica y Parinacota (18°30’S) hasta la Región del Libertador Bernardo O’Higgins (34°36’S), concentrándose en áreas rurales y periurbanas (MINSAL 2014). Se ha estimado que en el país existen entre 119.660 (OPS 2015) a 160.000 personas infectadas (Benítez *et al.* 2012) y 875.415 están en riesgo de contraer la infección en zonas endémicas (MINSAL 2014). En el año 1999 se declaró a Chile como país libre de transmisión vectorial al interior de la vivienda por *T. infestans*, gracias a la Iniciativa del Cono Sur de la OPS/OMS iniciada en 1991 (OMS 2000), pero poblaciones de vinchucas domésticas continúan existiendo en vida silvestre (Bacigalupo *et al.* 2015).

Los vectores involucrados en la transmisión del continente, son más de 140 especies pertenecientes a tres géneros, siendo *Triatoma infestans* el vector del ciclo doméstico Chile; y *Mepraia spinolai*, *Mepraia gajardoi* y *Mepraia parapatrica* del ciclo silvestre las presentes en el país (Canals *et al.* 2018). Otros mecanismos de transmisión corresponden a la vía transfusional, transplacentaria, trasplantes de órganos infectados y accidentes de laboratorio (Toso *et al.* 2011).

La ECh también ha sido registrada en tiempos antiguos en la costa desértica del norte de Chile y sur del Perú en contextos arqueológicos de población Chinchorro (7.050–3.000 A.C.) hasta el Período Colonial (1.550–1.850 D.C.), por amplificación de DNA en muestras de tejido momificado humano y coprolitos (Gühl *et al.* 1999; Aufderheide *et al.* 2004). Se ha propuesto que el asentamiento de tipo sedentario de los grupos Chinchorro, primeros pobladores de la costa desértica del Norte Grande de Chile y sur de Perú, se solapó al hábitat del ciclo silvestre del vector y posteriormente con el paso de las generaciones el vector transitó gradualmente hacia al ciclo doméstico (Aufderheide *et al.* 2004).

En los últimos años, la ECh se ha vuelto una infección emergente en países no endémicos por los movimientos migratorios de población latinoamericana que la han dispersado a Canadá, Estados Unidos, varios países de Europa, Australia y Japón (Lidani *et al.* 2019). Los mecanismos de transmisión han sido principalmente por transfusiones de sangre, transmisión congénita y trasplantes de órganos, aunque las dos primeras han sido los mecanismos que han dispersado la infección a zonas urbanas y países no endémicos (Rassi *et al.* 2010).

Posteriormente a la infección inicial con *T. cruzi*, la ECh se presenta en tres fases clínicas: aguda, indeterminada o latente y crónica (Apt 2013). Durante la fase aguda, que dura de 4 a 8 semanas, la sintomatología es variable. La mayor parte de los infectados se mantiene en la fase indeterminada sin síntomas (Apt 2013; Zingales 2018). Sin embargo, aproximadamente un 30% de los enfermos crónicos presentan alteraciones cardíacas y hasta un 10% padecen alteraciones digestivas, neurológicas o combinadas (OMS 2020).

Trypanosoma cruzi presenta tres estados evolutivos. La forma infectante es el tripomastigote, fusiforme y citoplasma granuloso. Los tripomastigotes se encuentran en la sangre de los hospederos vertebrados y los tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior de los triatominos. Los esferomastigotes son formas redondeadas y de flagelo corto que abundan en el estómago de los vectores. La forma de reproducción en el intestino medio del vector se llama epimastigote. Los amastigotes tienen forma redondeada u ovalada, sin flagelo y por tanto sin capacidad de movilidad. Corresponden a la forma reproductiva en el hospedero vertebrado y se suelen agrupar entre las fibras musculares como “nidos de amastigotes” (Apt 2013). Ver en Figura 1 las principales formas de *T. cruzi* al microscopio.

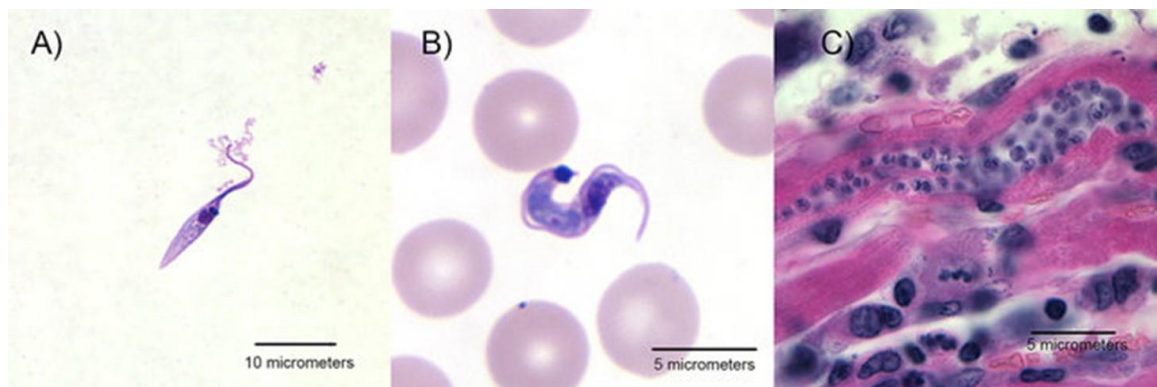


Figura 1. Las formas de *T. cruzi*. A) Epimastigote en tinción Giemsa. B) Tripomastigote en en sangre con tinción Giemsa. C) Nido de Amastigotes en miocitos de corazón en paciente con ECh crónico, tinción hematoxilina y eosina. Figura tomada de Bern *et al.* 2019.

El modelo del ciclo biológico de la enfermedad comienza con una vinchuca infectada que se acerca al mamífero para alimentarse de sangre, minutos después deposita sus deyecciones cargadas de tripomastigotes metacíclicos en la superficie de la piel. Las formas infectantes ingresan al interior del organismo por las microlesiones producidas por la picadura, membranas mucosas o superficie conjuntival. Dentro de la célula, los tripomastigotes se diferencian en amastigotes y se inicia la multiplicación. Cuando la célula hospedera se llena de parásitos, ésta se rompe liberando tripomastigotes que se diseminan a través de la sangre y de la linfa, invadiendo nuevas células o tejidos, principalmente tejido muscular de corazón, colon y esófago. Los tripomastigotes circulantes en el torrente sanguíneo pueden ser captados nuevamente por una vinchuca que se alimenta de un organismo infectado (Apt 2013; Rassi *et al.* 2010). En la Figura 2 se presenta un esquema del ciclo biológico del *T. cruzi*.

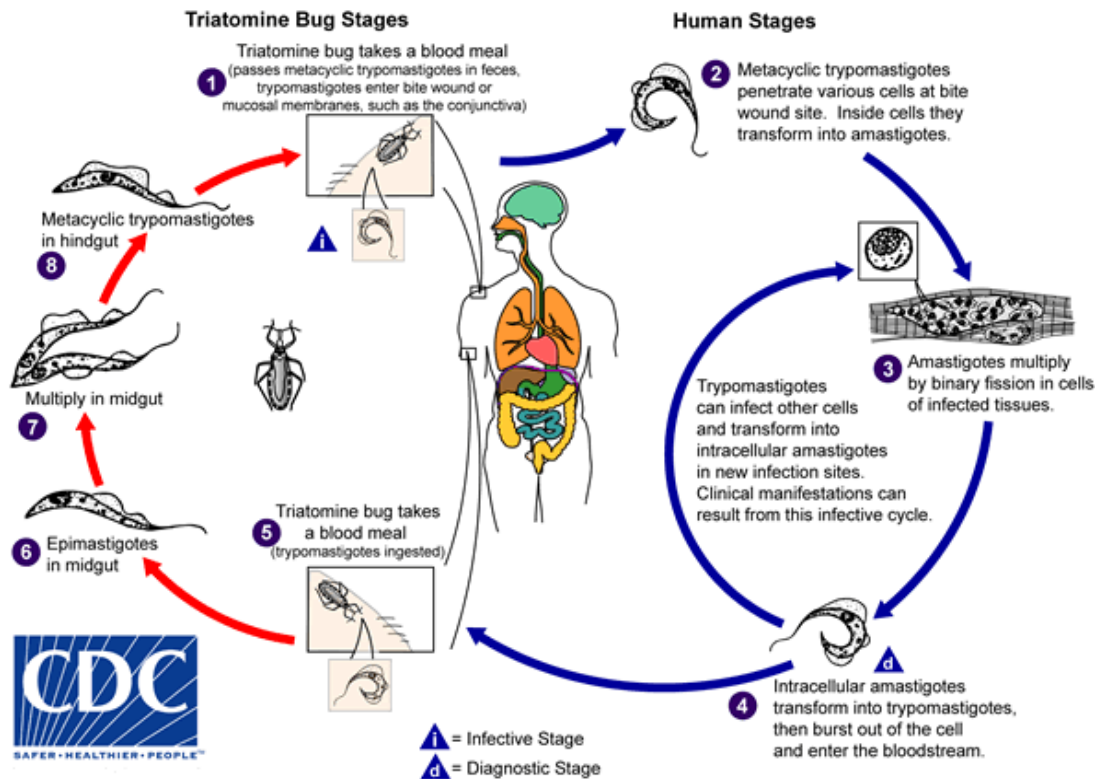


Figura 2. Ciclo biológico de *T. cruzi*. Figura tomada del Center for Disease Control and Prevention (<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>).

La ECh presenta una fuerte asociación a zonas rurales y suburbanas en condiciones de pobreza, causando gran carga socioeconómica para América Latina (Stanaway y Roth 2015). Asimismo, ampliando la mirada de la ECh más allá del punto de vista médico, ésta se extiende en dimensiones que combinan aspectos socio-culturales, económicos, políticos, ambientales e históricos (Dias *et al.* 2012; Storino 2013; Dias y Schofield 2017). En general, los estudios sobre ECh se han abordado desde un enfoque micro-social, es decir, desde de la vivienda y la familia. Las condiciones de la vivienda, sus cualidades o carencias sería lo que permite u obliga a la exposición al riesgo de contraer la enfermedad (Briceño-León 2003). Según Dias y Schofield (2017), desde un punto de vista más amplio, el contexto social de la ECh se caracteriza por: 1) la pobreza de la población de América Latina y problemas en los sistemas de salud públicos; 2) afecta a individuos iletrados; 3) inequidad de los sistemas de producción y sin la necesaria atención gubernamental.

Dentro del territorio chileno, según el MINSAL, se ha reportado una prevalencia de infección de 0,7 % de la población, 1,5% de población rural y 0,6% de población urbana (MINSAL 2014, 2016). Así mismo, los infectados con *T. cruzi* se concentran en las Regiones de Coquimbo y Atacama. La región que presenta la mayor tasa de incidencia es Coquimbo con 36,2 por cien mil habitantes, seguida por la Región de Antofagasta con 35,3 por cien mil habitantes, y la Región de Arica y Parinacota con 23,4 por cien mil habitantes (MINSAL 2016). En la Región de Coquimbo existe la tasa más alta de riesgo relativo de mortalidad ($15,43 \pm 11,89$) por ECh, seguida en orden decreciente, por la Región de Atacama, Valparaíso, Antofagasta y Tarapacá (Reyes *et al.* 2019).

En un estudio familiar realizado en la Provincia del Choapa realizado por Zulantay *et al.* (2013) con mujeres embarazadas (n = 70) infectadas por *T. cruzi*, se observó que la mayoría de

ellas provenía de sectores rurales (62,9 %), en general con un nivel de estudios de enseñanza básica y sólo un tercio de secundaria. Un 91,4% reportó haber habitado en viviendas de barro y paja en el techo durante su infancia y un 57,0% reconoció haber sido picada por la vinchuca. En este estudio familiar, se pudo detectar que de los familiares maternos que accedieron a la entrevista (n= 152), al menos el 49,3% también estaba infectado.

Para organizar y entender la diversidad genética de *T. cruzi* se han propuesto varias conceptualizaciones. En un principio, el estudio de análisis de isoenzimas en la década de 1970 dio paso a una nomenclatura de *T. cruzi* en tres zimodemas (Miles *et al.* 1978), que se refiere a la agrupación de varias cepas que comparten el mismo perfil isoenzimático. También, en la década de 1980, mediante isoenzimas la clasificación de *stocks* dio paso a la identificación de 43 *clonets* (Tibayrenc y Ayala 1988), que corresponden a conjuntos de *stocks* que aparecen indistinguibles en un conjunto de marcadores genéticos. Aunque el término DTU (*Discrete Typing Units*) lleva varios años, en un principio se distinguían TcI y las subdivisiones de TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIIId y TcIIe, por el análisis de isoenzimas y amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD). Los DTUs describen conjuntos de *stocks* que son genéticamente más similares entre sí que otros y que son identificados por marcadores moleculares comunes. El modelo de evolución de *T. cruzi* describe a esta especie como clonal, en que los descendientes son idénticos al genotipo fundador, sin descontar algunos eventos de recombinación genética en su historia evolutiva que habría dado origen a híbridos a partir de linajes parentales, a modo de evolución reticulada (Arnaud-Haond *et al.* 2014).

Actualmente, por consenso internacional las cepas de *T. cruzi* se dividen en seis clados monofiléticos: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI (Zingales *et al.* 2009), más una séptima DTU

identificada por primera vez en murciélagos llamada TcBat (Marcili *et al.* 2009). El concepto de Unidad Discreta de Tipificación (DTU) se refiere a un grupo de cepas de *T. cruzi* que son similares entre ellas más que otras cepas, y son identificables por marcadores moleculares (Zingales *et al.* 2012). Se puede considerar a las DTU, unidades confiables de análisis para epidemiología molecular y estudios experimentales en evolución. En la Figura 3 se puede apreciar una representación de la distribución geográfica de los DTUs.

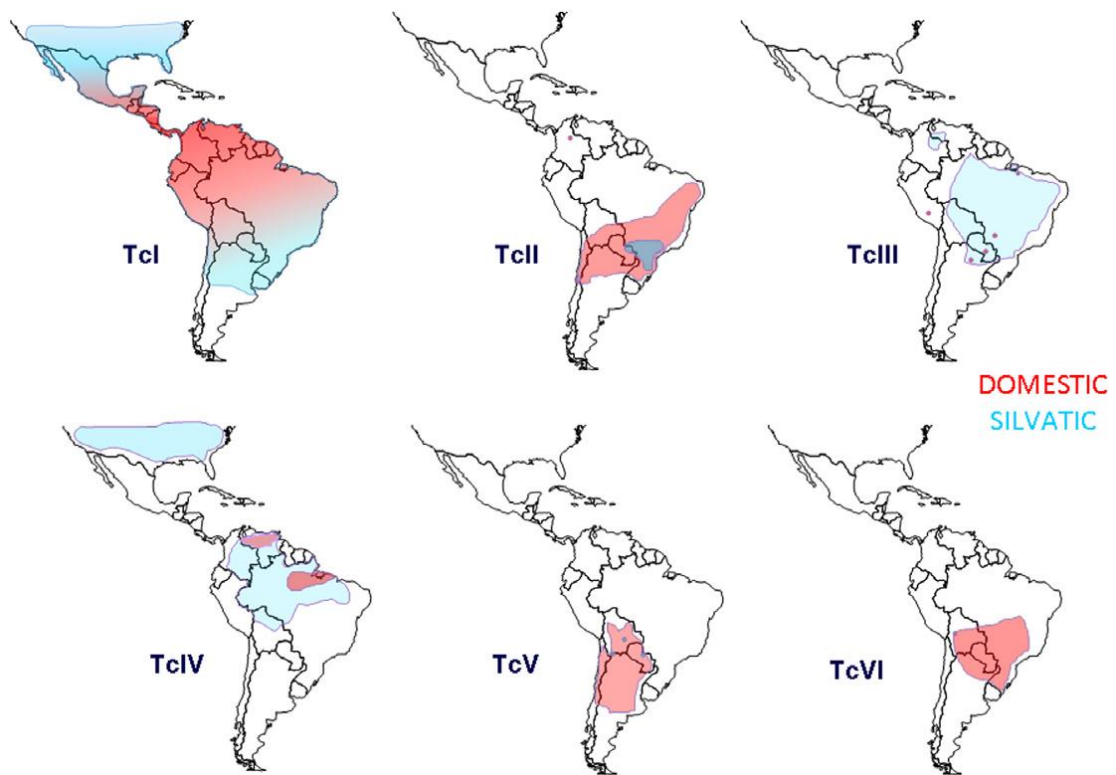


Figura 3. Representación geográfica aproximada de la distribución de los DTU de *T. cruzi*, en ciclos de transmisión doméstica y selvática. Figura tomada de Zingales *et al.* (2012).

El TcI es el DTU con la distribución geográfica más amplia y mayor diversidad genética interna, con ciclos de transmisión que se superponen entre el doméstico y selvático (Gühl y Ramírez 2011; Ramírez *et al.* 2012). Por otro lado, TcII, TcV y TcVI se encuentran

predominantemente en los países del cono sur (Zafra *et al.* 2008). La identificación de DTUs presentes y la diversidad dentro de éstas es importante, ya que diferentes genotipos podrían causar distintas patologías, circular en diferentes localidades y ciclos de transmisión, lo que afecta los esfuerzos de control, tratamiento y desarrollo de vacunas (Dorn *et al.* 2017).

La asociación de DTUs particulares con el espectro de las diversas formas de presentación clínica de la ECh es un área de intensa investigación (Rassi *et al.* 2010). La variabilidad en los síntomas de la ECh puede estar correlacionada con marcadores genéticos específicos en el parásito o en el huésped, aunque es probable que ambos afecten el resultado de la infección (Sturm *et al.* 2010). Geográficamente, las formas de megasíndromes en ECh se encuentran en la mitad sur de Sudamérica donde circulan los DTUs TcV y TcVI, y el megaesófago y megacolon son raros en la zona Norte y Centroamérica (Miles *et al.* 2009; Benítez *et al.* 2012).

El megaesófago y/o megacolon ocurre en al menos un 15% en pacientes como resultado de disfunción peristáltica. Los problemas gastrointestinales se han relacionado a la distribución de serotipos de *T. cruzi* y parece ser más común en regiones centrales de Brasil, menos frecuente en Bolivia, y prácticamente inexistente en Centroamérica y México (Zingales 2018). Por otro lado, las fallas cardíacas y cardiomiopatías están presentes en todo el continente, y en América Central y América del Norte el DTU TcI se asocia fuertemente con la infección (Benítez *et al.* 2012), aunque estas pueden ser realmente severas en el cono Sur (Zingales *et al.* 2012). No obstante, la asociación directa del espectro de la enfermedad particular y el DTU específico de *T. cruzi* sigue siendo difícil de alcanzar (Zingales 2018). Estudios recientes han comenzado a analizar los mecanismos asociados a estas diferencias, mostrando que al menos algunos de los diferentes espectros de la ECh son probablemente

debido a diferentes DTUs (Britto 2009). Además, los DTUs particulares involucrados en infecciones humanas también deben ser considerados para los estudios de eficacia del tratamiento y diseño de fármacos (Dorn *et al.* 2017).

En casos de personas afectadas con ECh asintomáticas o sintomáticas, los genotipos circulantes más frecuentes en humanos latinoamericanos son diversos. En Brasil, las formas infectivas más reportadas son TcI, TcII y TcV, y particularmente en la Amazonia TcI y TcIV. En Argentina los DTU más frecuentes son TcIV y TcV seguido del TcI y TcII (Bizai *et al.* 2020); en la zona del Chaco son TcIV y TcV (Lucero *et al.* 2016). Entre Perú y Bolivia circulan frecuentemente TcI y TcV (Barnabé *et al.* 2011). En Colombia, parece predominar TcI, en especial TcIDom¹ en casos crónicos (Hernández *et al.* 2016). TcII está asociado significativamente a la ausencia de problemas cardíacos, pero la prevalencia de hipertrofia del ventrículo izquierdo se asocia al mismo DTU. Además, se observa una alta frecuencia de TcI en pacientes con cardiopatía (Muñoz-San Martín *et al.* 2018). En un reciente estudio de Bizai *et al.* (2020), en Argentina los DTUs TcVI y TcII estaban asociados al desarrollo de cardiopatía; en cambio TcV presentaba una asociación significativa en aquellas personas que no han desarrollado la enfermedad por 20 años, por sobre aquellas con cardiopatía. Sin embargo, a la fecha se desconoce la existencia de marcadores genéticos asociados a severidad de la infección (Zingales *et al.* 2012).

En Chile, las provincias de Choapa y Limarí son parte del centro norte del país, una zona semiárida donde domina el ecosistema de tipo mediterráneo (Armesto *et al.* 2007; Montecinos *et al.* 2016). En esta zona los pequeños mamíferos son muy abundantes, presentan ámbitos de hogar reducidos y también están altamente infectados con *T. cruzi*, siendo importantes reservorios de la ECh (Botto Mahan *et al.* 2005; Chacón *et al.* 2016; Ihle Soto *et al.* 2019). Los

¹ TcDOM son todas aquellas cepas de TcI de ciclos domésticos, en oposición a las TcI de ciclo silvestre.

vectores conocidos en el territorio chileno se alimentan de humanos, gatos, perros, roedores, conejos, artiodáctilos (*e.g.*, vacas, cabras, cerdos, guanacos), aves y reptiles (Canals *et al.* 2001, 2018; Chacón *et al.* 2016; Ihle-Soto *et al.* 2019). Del conjunto de pequeños mamíferos silvestres y domésticos infectados en la zona hay roedores (*Octodon degus*, *Phyllotis darwini*, *Abrothrix olivaceus*, *Rattus rattus*), conejos (*Oryctolagus cuniculus*), y un marsupial (*Thylamys elegans*) (Bacigalupo *et al.* 2006; Ihle Soto *et al.* 2019). Ver Figura 4 para una representación de especies infectadas con *T. cruzi* en Chile.

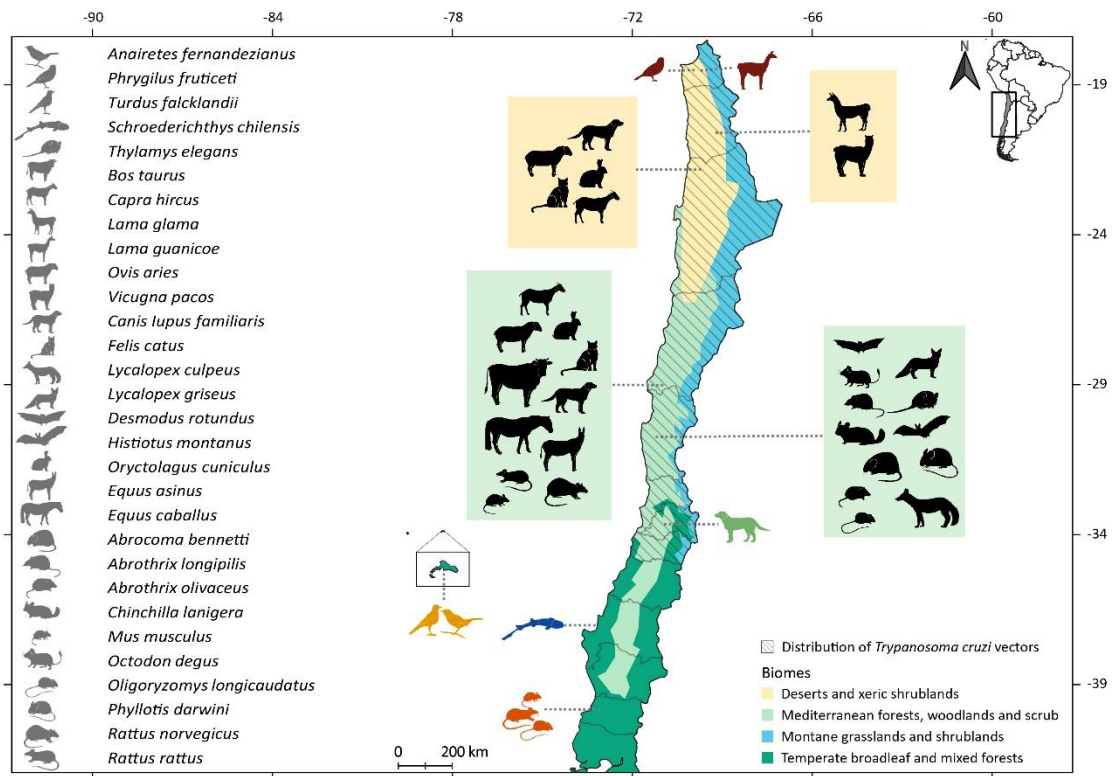


Figura 4. Mapa de Chile con la representación de los biomas de Chile en colores más la distribución de especies de vertebrados afectados por *Tripanosomatídeos*. Los vertebrados nativos e introducidos infectados con *Trypanosoma cruzi* están representados en negro. En líneas achuradas el área de distribución de las especies de triatomíneos que hay en Chile. Figura tomada de Correa *et al.* (2020).

Según Campos-Soto *et al.* (2016), en los triatominos silvestres *M. gajardoi* y *M. spinolai* de la zona norte-centro del país se han detectado los DTU TcI, TcII, TcV y TcVI con infecciones mixtas. En el vector silvestre *M. gajardoi*, alimentados por XD sobre *O. degus* tiene preferencia por TcI y TcVI, y menos por TcV (Sandoval *et al.* 2019). En cambio, en *T. infestans* recolectados dentro de la Región Metropolitana TcI fue detectado en el 100% de vectores domésticos y en un 93% de vectores silvestres, presente tanto en infecciones únicas y mixtas. Aquellas poblaciones silvestres tenían una mayor cantidad de infecciones mixtas de TcII, TcV y TcVI (Bacigalupo *et al.* 2012). El xenodiagnóstico (XD)² de *T. infestans* en *O. degus* amplifica más el TcI que el vector silvestre *M. gajardoi*, probablemente porque están menos adaptados a los ciclos silvestres (Campos *et al.* 2007).

Por otra parte, desde hace algunos años se ha podido comprobar que existe una transmisibilidad diferencial de los genotipos clonales por parte del vector *T. infestans* en condiciones de infección experimental (de Lana *et al.* 1998; da Silveira Pinto *et al.* 1998, 2000; Bosseno *et al.* 2000). Por ejemplo, la combinación de la prueba de XD, cultivo celular y diversas estrategias de tipificación de genotipos (*e.g.*, hibridación de DNA, identificación de isoenzimas, Multilocus Sequence Typing, entre otras), han traído consigo nuevas interrogantes con respecto a la transmisibilidad de *T. cruzi* (Bosseno *et al.* 2000; da Silveira *et al.* 2000). En el trabajo de Ortiz *et al.* (2015), los DTUs de pacientes con Ech de la Provincia de Choapa en el norte semiárido de Chile, detectados por hibridación de DNA, fueron TcI, TcII, TcV y TcVI. En cambio, los DTUs obtenidos por XD y cultivo axénico fue únicamente TcV. En el presente trabajo, a diferencia de Ortiz *et al.* (2015) la forma de genotipificación fue la aplicación de

² El XD es una técnica que utiliza triatominos axénicos criados en laboratorio para amplificar naturalmente, algún microorganismo en este caso *T. cruzi*.

partidores específicos diseñados con la herramienta de edición gratuita *Beacon Designer™* para ser aplicados con la metodología de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR tiempo real) (Muñoz-San Martín *et al.* 2018), lo cual también tendría implicancias en la sensibilidad de detección de los diversos genotipos.

2. Hipótesis de Trabajo

Las Unidades Discretas de Tipificación (DTUs) de *Trypanosoma cruzi* circulantes en pacientes con enfermedad de Chagas crónica y genotipificadas por PCR tiempo real, evidencian que las poblaciones difieren según sean detectadas en sangre periférica o deyecciones de vectores triatomínicos axénicos de *Triatoma infestans*

3. Objetivo General

Comparar las Unidades Discretas de Tipificación (DTUs) de *Trypanosoma cruzi* que circulan en individuos con enfermedad de Chagas crónica, a través del análisis mediante PCR tiempo real, de sangre periférica y deyecciones de vectores triatomínicos axénicos de *Triatoma infestans*.

4. Objetivos Específicos

- 1- Determinar los DTUs de *Trypanosoma cruzi* presentes en deyecciones de *Triatoma infestans* alimentados sobre individuos con enfermedad de Chagas crónica del semiárido de Chile.

- 2- Determinar los DTUs de *Trypanosoma cruzi* presentes en sangre periférica de individuos con enfermedad de Chagas crónica de la zona del semiárido de Chile.
- 3- Comparar el patrón de frecuencias de los DTUs de *Trypanosoma cruzi*, según el tipo de muestra biológica analizada.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Grupo de estudio

La población en estudio corresponde a 14 pacientes con ECh, confirmada mediante serología convencional (ELISA e IFI IgG), pesquisados en control por esta parasitosis en centros de salud urbanos y rurales de la Provincia de Choapa (Illapel y Salamanca) y Limarí (Combarbalá), entre los 29° 02' y 32° 16' S. Todos ellos aceptaron formar parte del estudio bajo Consentimiento Informado (Proyecto FONDECYT 1100768, IR: Dra. Inés Zulantay) aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Resolución 049-2009). Los datos de los pacientes con ECh crónica fueron recolectados entre los años 2010 a 2014 (Ver Tabla 1).

Los criterios de inclusión, que limitan el número de casos del grupo de estudio, consideraron:

- Personas con ECh confirmada mediante dos técnicas de serología convencional (IFI y ELISA IgG).
- No haber sido anteriormente sometidos a tratamiento tripanocida.
- Proceder de la misma área endémica (sector rural o urbano).
- Encuesta epidemiológica con antecedentes demográficos.
- Disponibilidad de ADN genómico de muestras de sangre periférica.
- Disponibilidad de ADN genómico obtenido de muestras de deyección de cultivo axénico en xenodiagnóstico de 30, 60 y 90 días de incubación y pool preparado con dichas muestras.

- Ambas muestras (sangre y deyección) obtenidas en forma paralela (mismo día y hora de control).
- Presencia de *T. cruzi* detectada en sangre periférica mediante PCR convencional previo al estudio, mediante la observación de la banda específica de *T. cruzi* de 330 pb detectada con los partidores kinetoplastídicos 121-122.
- Estudio microscópico positivo (observación de formas tripomastigotes móviles) de deyecciones obtenidas de xenodiagnóstico a los 30, 60 y 90 días de incubación.

Tabla 1. Grupo de estudio de pacientes con enfermedad de Chagas crónico con Xenodiagnóstico 30 y/o 60 y/o 90 días positivo, procedentes de la Región de Coquimbo. Para el XD, (+) presenta positividad en una caja, 2 (+) en dos cajas y (-) sin detección microscópica de formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Caso	ID	Sexo	Edad	XD			Cardiopatía	Localidad
				30 d	60 d	90 d		
1	1727	M	32	(-)	(+)	S/M	No	Illapel
2	1814	M	58	(-)	(+)	(-)	Sí	Combarbalá
3	1821	F	53	(-)	(-)	(+)	Sí	Combarbalá
4	1861	F	53	(+)	(-)	(+)	No	Salamanca
5	1939	F	33	(-)	(+)	(+)	No	Combarbalá
6	2431	F	63	(-)	(+)	(+)	No	Combarbalá
7	2934	M	54	(-)	2 (+)	2 (+)	Sí	Combarbalá
8	2946	M	68	(-)	2 (+)	2 (+)	Sí	Combarbalá
9	2966	M	76	2 (+)	2 (+)	2 (+)	Sí	Combarbalá
10	3114	F	20	(-)	(+)	(+)	No	Salamanca
11	3158	F	53	(-)	2 (+)	2 (+)	Sí	Salamanca
12	3412	M	56	(+)	2 (+)	2 (+)	No	Illapel
13	3738	M	58	(+)	(+)	(+)	Sí	Illapel
14	3758	F	53	2 (+)	(+)	(+)	No	Salamanca

2. Muestras

2.1 Xenodiagnóstico (XD)

A los pacientes en estudio se les aplicó la técnica de XD descrita por Schenone (1999), consistente en dos cajas cilíndricas de madera, cubiertas por una pieza de gasa, cada una con siete ninfas de tercer o cuarto estadio de *T. infestans* libres de infección, sometidas a ayuno durante un periodo de 3-4 semanas. Los insectos fueron alimentados por 20 a 30 minutos en la cara externa de cada brazo del paciente, luego las ninfas fueron incubadas a 27°C y 75% de humedad en una cámara de crianza. Después de 30, 60 y 90 días de incubación, las muestras de deyecciones de los triatominos se obtuvieron mediante la compresión abdominal en una campana de bioseguridad y se analizaron al microscopio en búsqueda de formas de tripomastigotes móviles del parásito. En algunos casos ambas cajas resultaron positivas.

2.2 Muestras biológicas de Xenodiagnóstico

Se preparó un *pool* de las deyecciones de los triatominos analizados a los 30, 60 y 90 días de incubación, las que fueron diluidas en 500 µl de PBS pH 7,2. Posteriormente, el *pool* fue incubado durante 15 minutos a 98°C y centrifugado por 3 minutos a 3.500 rpm. Los sobrenadantes de 200 µl fueron almacenados a -20°C hasta su uso. Se utilizaron como muestras control cepas de *T. cruzi* cedidas por los Dres. Gonzalo Cabrera (Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile), Aldo Solari y Sylvia Ortiz (Departamento de Biología Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile), Juan Diego Maya y Michel Lapier (Programa de Farmacología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) correspondientes a los DTUs TcI, TcII y TcV. El detalle de los DTU y cepas de referencia se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas de referencia representativas de los DTU de *Trypanosoma cruzi* más frecuentes en Chile utilizados en la evaluación de la *performance* analítica de los ensayos de genotipificación mediante PCR.

DTU	Cepa de referencia	Origen geográfico	Origen biológico
TcI	Dm28c	Carabobo, Venezuela	<i>Didelphis marsupialis</i>
TcII	Y	Sao Paulo, Brasil	<i>Homo sapiens</i>
TcV	92.80	Santa Cruz, Bolivia	<i>Homo sapiens</i>

2.3 Extracción de DNA en Xenodiagnóstico

Antes de realizar el proceso de extracción de DNA de las deyecciones, se agregó 20 ng de DNA de sangre humana negativa para *T. cruzi* como control interno exógeno. La purificación del DNA se realizó utilizando un volumen inicial de 100 µl con el kit de extracción de DNA genómico FavorPrep Blood Mini kit (Favorgen, Biotech Corp.), modificado por la omisión de la etapa de lisis de células con proteinasa K. El eluido fue conservado a -20°C hasta que se llevó a cabo el qPCR-Xenodiagnóstico (qPCR-XD).

2.4 Obtención y purificación de DNA de muestras de sangre para qPCR

Se utilizaron muestras de sangre periférica obtenidas antes del tratamiento de los pacientes (año 2009). Éstas se obtuvieron mediante punción venosa y fueron almacenadas en tubos Venoject en volumen 1:1 con solución de Guanidina HCl-EDTA (2 ml de sangre en 2 ml de solución preservante-anticoagulante). Las muestras fueron incubadas a 98°C por 15 minutos para favorecer el desencadenamiento de la red de minicírculos de *T. cruzi* y conservadas a 4°C hasta la extracción de DNA. La purificación de DNA presente se realizó a partir de un volumen de 20 µL, según las instrucciones del kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

3. PCR en Tiempo Real

3.1 Curva estándar y sistema de detección SYBR Green

Para obtener DNA parasitario y generar la curva estándar para la cuantificación mediante qPCR, se utilizó un stock de formas epimastigotes de *T. cruzi* cepa DM28c e Y obtenidas de cultivo axénico. La curva estándar fue realizada con diluciones seriadas en orden 10, a partir de la muestra de sangre de un donante sano experimentalmente infectado con 10^6 parásitos equivalentes/mL (par-eq/mL) y posterior extracción del DNA. Considerando que una célula parasitaria posee aproximadamente 200 fg de DNA, realizada con iguales cantidades (20 ng de cada uno/200 μ L sangre) de las cepas de referencia Dm28c e Y (Tabla 3).

Tabla 3. Equivalencias en distintas unidades de masa de DNA de *T. cruzi* para una determinada concentración de parásitos.

Concentración Parásitos	Parásitos por mililitro (p/ml)	Cantidad de DNA en femtogramos (fg)/ml	Cantidad de DNA en nanogramos (ng)/ml	Cantidad de DNA en microgramos (μ g)/ml
1×10^6	1.000.000 p/ml	200.000.000 fg	200 ng	0,2 μ g
1×10^5	100.000 p/ml	20.000.000 fg	20 ng	0,02 μ g
1×10^4	10.000 p/ml	2.000.000 fg	2 ng	0,002 μ g
1×10^3	1.000 p/ml	200.000 fg	0,2 ng	0,0002 μ g
1×10^2	100 p/ml	20.000 fg	0,02 ng	0,00002 μ g
1×10^1	10 p/ml	2.000 fg	0,002 ng	0,000002 μ g
1×10^0	1 p/ml	200 fg	0,0002 ng	0,0000002 μ g
1×10^{-1}	0,1 p/ml	20 fg	0,00002 ng	0,00000002 μ g

3.2 Cuantificación de *T. cruzi*

La carga parasitaria fue cuantificada en las muestras en estudio mediante ensayos de PCR cuantitativo (qPCR) con el sistema de detección SYBR[®] Green en equipo Mx3000P™

Stratagene (Agilent Technologies), utilizando los *partidores* de DNA de satélites nucleares cruzi 1 (5'-ASTCGGCTGATCGTTTTCGA-3') y cruzi 2 (5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3') a una concentración de 0,3 μ M. El volumen final de reacción fue de 20 μ L que contenía: 2 μ L de DNA templado, 1X Brilliant III Ultra-Fast SYBR[®] Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies), 0,3 μ M de *partidores* y Reference Dye (ROX). Las condiciones de la reacción incluyeron una preincubación por 1 segundo a 25°C y 3 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos a 95°C por 5 segundos y 60°C por 20 segundos. Se utilizaron como controles negativos, agua libre de nucleasas y DNA humano seronegativo. Como control positivo, se incluyeron cepas de referencia de los DTUs TcI, TcII y TcV. Se consideró un resultado como negativo (ausencia de detección de *T. cruzi*) cuando el valor de emisión de fluorescencia fue informado como No Ct (no cuantificable). Por otra parte, los resultados positivos fueron informados en par-eq/mL.

3.3 Genotipificación mediante PCR cuantitativo

El proceso de genotipificación se llevó a cabo aplicando la metodología SYBR[®] Green, a fin de identificar los DTUs de *T. cruzi* presentes en cada una de las muestras y cuya parasitemia fue demostrada previamente en forma cualitativa y cuantitativa. Se buscó identificar los DTUs TcI, TcII y TcV que corresponden a los genotipos de mayor frecuencia en Chile.

La concentración de los *partidores* diseñados (Muñoz-San Martín *et al.* 2018), así como su secuencia se detallan en la Tabla 4. Las muestras del grupo de estudio fueron procesadas en duplicado y cada ensayo incluyó un control no templado (agua libre de nucleasas), control positivo (20 fg/ μ L de DNA genómico de referencia del DTU correspondiente al ensayo) y control negativo (20 fg/ μ L de DNA genómico de referencia no específico al DTU correspondiente al

ensayo y DNA de sangre humana seronegativa). Las cepas de referencia utilizadas dependiendo del ensayo fueron Dm28c (Tcl), Y (TcII) y 92.80 (TcV).

Tabla 4. Secuencias y concentraciones de los *partidores* utilizados en ensayos de genotipificación mediante qPCR de las Unidades Discretas de Tipificación (DTUs).

DTU	Gen	Nombre	Secuencia (5´- 3´)	Concentración final (µM)
Tcl	SL-IR	Tcl SL-IR Fw	GCTTTGTGTTCTCGCACTCCA	0,4
		Tcl SL-IR Rv	CGATCAGCGCCACAGAAAGT	0,4
TcII	COII	TcII COII Fw	GGATTACATCTACGGCTGACACC	0,2
		TcII COII Rv	CGAGAGTGATTATTTGGTGGGAGATA	0,2
TcV	ND1	TcV ND1 Fw	AGTTTTATTAATCTTATCAGGATTTGGTG	0,5
		TcV ND1 Rv	CCATCTGTGATAGGTGTTAATATTCC	0,5

3.4 Algoritmo de identificación de DTUs de *T. cruzi*

En este estudio se identificaron los distintos DTUs mediante el análisis de curvas de disociación resultantes de ensayos de SYBR[®] Green qPCR. Cada producto de amplificación de PCR posee una Temperatura de desnaturalación térmica (T_m) específica, temperatura a la que el 50% del DNA se encuentra desnaturalado, basada en la longitud del fragmento y composición nucleotídica.

Las curvas de disociación muestran un gradiente de temperatura en la que se grafica la cinética de disociación de los fragmentos amplificados, donde el *peak* de la curva corresponde a la Temperatura de desnaturalación. La T_m específica para cada segmento amplificado en cada DTU es 86,8°C (Tcl), 77,8°C (TcII) y 77,7°C (TcV). Se aceptó un margen de error de 0,25 en el *peak* de las curvas de disociación.

4. Análisis Estadístico

Para comparar si existía diferencia en la composición y carga de los DTUs infectantes entre sangre periférica de pacientes con ECh y deyecciones de vectores triatominos, se realizó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) y la prueba U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

1. Estructura poblacional de la muestra

La composición poblacional de la muestra utilizada fue de siete mujeres y siete hombres. Las edades de las mujeres fluctuaron entre los 20 y los 53 años, con un promedio de 46,85 años. En los hombres, las edades fluctuaron entre los 32 a 76 años, con un promedio de 57,42 años. Entre ambos grupos hubo una diferencia de 10.57 años. La mitad de los pacientes presentan cardiopatía y la otra mitad no. Tres pacientes provienen de la localidad de Illapel (21,42%), siete de Combarbalá (50%) y cuatro de Salamanca (28,57%).

2. Carga parasitaria de las muestras biológicas

En el proceso de cuantificación de *T. cruzi* mediante qPCR en las muestras de deyecciones por XD, en la totalidad de los casos fue posible determinar las cargas parasitarias correspondientes (Tabla 4). Cada ensayo de cuantificación mediante qPCR se realizó en duplicado. Los valores para la carga parasitaria en deyecciones oscilaron ampliamente entre 1,79 a 140.650 par.eq/ml. El caso 04 obtuvo la menor carga parasitaria con 1,79 par.eq/ml y el caso 01 la más alta con 140.650 par.eq/ml y la segunda más alta fue el caso 12 con 3.277 par.eq/ mL. En los casos 03 y 04 que no amplificaron para algunos de los DTUs, la carga parasitaria fue 12,65 y 1,79 par.eq/mL, respectivamente. El promedio obtenido de todas las muestras en deyecciones fue de $10.512,2 \pm 37.466$ par.eq/mL y una mediana de 147,25 par.eq/mL.

Tabla 4. Resumen de resultados de la amplificación por qPCR presentados por caso, sexo, edad, cardiopatía, cuantificación (par.eq/ml) y DTU.

Caso	ID	Sexo, Edad	Cardiopatía	Xenodiagnóstico		Sangre periférica	
				par.eq / mL	DTU	par.eq / mL	DTU
1	1727	M, 32	No	140.650	TcII	4,79	-
2	1814	M, 58	Sí	101,5	TcV	6,88	-
3	1821	F, 53	Sí	12,65	-	22,4	TcV
4	1861	F, 53	No	1,79	-	31,1	TcI
5	1939	F,33	No	221	TcV	17,6	-
6	2431	F, 63	No	51,5	TcV	26,75	-
7	2934	M, 54	Sí	134	TcI - TcV	4,76	-
8	2946	M, 68	Sí	51	TcV	13	TcV
9	2966	M, 76	Sí	1.388,50	TcII - TcV	90,4	TcV
10	3114	F, 20	No	653,5	TcII - TcV	9,46	TcII - TcV
11	3158	F, 53	Sí	160,5	TcV	4,24	-
12	3412	M, 56	No	3.277	TcI - TcV	1,55	-
13	3738	M, 58	Sí	9,37	TcII - TcV	0,72	-
14	3758	F, 53	No	486,5	TcV	17,2	-

No obstante, para las muestras en sangre periférica, la mayoría arrojó cifras de baja carga parasitaria. El valor más bajo fue obtenido por el caso 13 con 0,72 par.eq/mL y la más alta fue el caso 09 con 90,4 par.eq/ml. El 50% de las muestras en sangre se mantuvieron en cifras bajo los 10 par.eq/mL aproximadamente. De las muestras de sangre, se obtuvo un promedio de $17,91 \pm 22,93$ par.eq/mL y una mediana de 11,23 par.eq/mL. La prueba U de Mann-Whitney arroja diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) entre las cargas parasitarias de ambas muestras biológicas.

3. Genotipificación en muestras de XD y sangre periférica

De un total de 14 casos de pacientes con ECh, en la prueba del XD, 12 casos fueron positivos, equivalente al 85,71%. En los casos positivos se detectaron por separado los DTU TcI,

TcII y TcV, correspondientes a dos, cuatro y 11 casos, respectivamente. Para el ensayo en sangre periférica, la mayoría de las muestras no amplificaron (64,28 %) y cinco muestras fueron concordantes con un DTU (35,71 %). Los resultados de la genotipificación se presentan en la Tabla 4.

Al comparar XD y sangre periférica por el total de DTU, la primera metodología detectó significativamente más genotipos ($\chi^2 = 7.34$, $p < 0.01$). En tanto, considerando los DTU positivos, el XD amplificó más el TcV ($\chi^2 = 7.04$, $p < 0.01$) que otro DTU.

En la qPCR-XD las frecuencias simples (i.e., con un único DTU) se detectaron en siete casos (50%), mientras que DTUs mixtos fueron detectados en cinco casos (35,71 %). En dos casos no se detectó ningún DTU (14,28 %). En cuanto a casos con infecciones únicas, el DTU TcII se detectó en un caso (7,14%) y TcV en seis casos (42,85%). Por otro lado, en cuanto a presencias mixtas, se detectó TcI+TcV en dos casos (14,28%) y tres casos para TcII+TcV (21,42%). No se obtuvieron diferencias significativas entre frecuencias de infecciones únicas y mixtas ($\chi^2 = 2,29$; $p = 0.13$). En general, TcV fue el DTU más frecuentemente detectado por qPCR con diferencias significativas ($\chi^2 = 14.03$, $p < 0.001$), en comparación a los otros dos DTUs.

En las muestras de sangre, se puede apreciar nueve casos negativos (64,28%), un caso con TcI (7,14 %), tres casos sólo con TcV (21,42 %) y un caso con TcII+TcV (7,14 %). El detalle de las frecuencias para XD y sangre se presentan en la Figura 5.

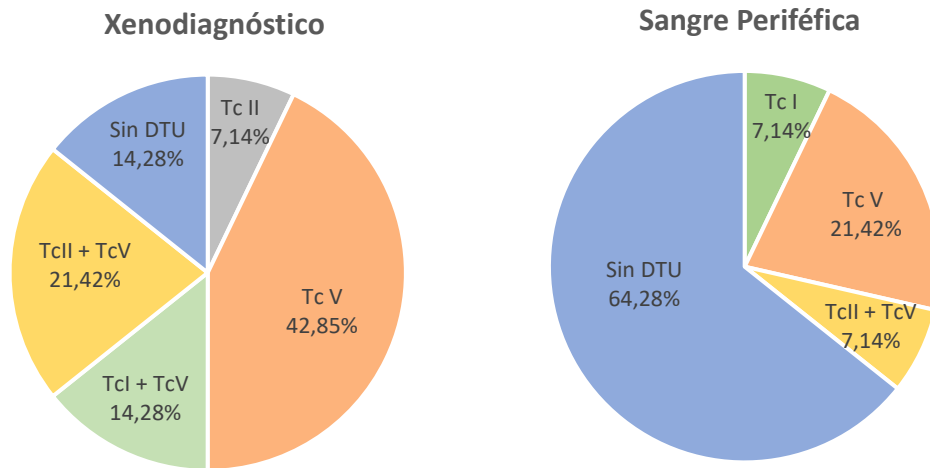


Figura 5. Frecuencias obtenidas por cada DTU para Xenodiagnóstico y sangre periférica en presencia simple y mixta.

Con respecto a las muestras que no amplificaron en el XD, se observó una baja carga parasitaria, evidenciando que no son muestras óptimas para ensayos de genotipificación por qPCR. Es preciso reportar, que durante los ensayos de qPCR se generaron algunas curvas de disociación no coincidentes con la temperatura específica para uno de los tres DTUs. El hecho que hubiese muestras con amplificación no específica, se puede atribuir a la presencia de un DTU diferente a los ensayados o a procesos de amplificación inespecífica.

DISCUSION

El estudio de la ECh, entendido en forma multidisciplinaria, contemplando las áreas veterinaria, ecológica, clínica, evolutiva, entre otras; considera que la salud tanto de humanos, animales, vegetales y el medio ambiente son esenciales para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas, tal como lo define el concepto de “Una Salud” (“One Health”) de la OMS. Desde la diversidad y la genotipificación del *T. cruzi* se pretende aportar a un relato que integre el conocimiento de otras disciplinas y que vaya más allá de la perspectiva clínica.

Una observación relevante, se refiere a la baja positividad en las muestras en sangre al qPCR. Sólo en el 35,71% (5/14) de las muestras de sangre fue posible amplificar uno de los DTUs, probablemente por la pequeña cantidad de pacientes de la muestra. No obstante, en estudios con mayor tamaño muestral para qPCR en sangre periférica humana, se logró detección de DTUs en el 67,9% (Muñoz-San Martín *et al.* 2017), 53% (Carrasco y Fuentealba 2017) y 61,4 % (Rozas-Marín 2018). Para los casos negativos es probable que una baja carga parasitaria y la liberación intermitente de tripomastigotes al torrente sanguíneo en infecciones crónicas (Hernández *et al.* 2016), explique la baja frecuencia de positivos. El 50% de los casos obtuvo una carga parasitaria por debajo del promedio y la mediana para sangre periférica. Conviene subrayar que la baja carga parasitaria en sangre se perfila como el mayor problema para este tipo de muestra. En Saavedra *et al.* (2016), se describe que la mayoría de las muestras de sangre evaluadas mediante qPCR se mantuvieron bajo los 10 par.eq/mL.

Al analizar los genotipos detectados en muestras de sangre, se observa que el más frecuente fue DTU TcV (21%), seguido de TcI (7%) y TcII+TcV (7%). En una muestra de mayor

tamaño, la genotipificación en sangre periférica fue realizada con sondas de hibridación de DNA del minicírculo, donde los DTU más frecuentes en orden decreciente fueron TcV, TcI, TcII y TcVI, pero sin distinción entre pacientes con y sin cardiopatía (Apt *et al.* 2015).

En cuanto a la frecuencia de DTUs, hay nueve pacientes (64,28%) con infección simple y los cinco restantes presentan infección mixta por dos DTUs (TcI+TcV y TcII+TcV). Aunque la genotipificación con sólo tres DTUs en el presente estudio también es un sesgo en contra de los restantes DTUs (Carrasco y Fuentealba 2017), pues se ha reportado con anterioridad infecciones con TcVI en pacientes chilenos por qPCR (Muñoz-San Martín *et al.* 2017, 2018). La cepa Tulahuén de TcVI, podría ser incorporada como cepa de referencia en futuras investigaciones de genotipificación. Además, teniendo en consideración la *performance* analítica de genotipificación mediante qPCR con sondas TaqMan, Cura *et al.* (2015) no consiguió tipificar una proporción de muestras de sangre periférica de pacientes crónicos con baja carga parasitaria.

Estas observaciones pueden tener estrecha relación con la sensibilidad del método para tipificar DTUs de *T. cruzi* directamente en sangre periférica. Según datos no publicados obtenidos en el laboratorio durante al menos dos años de trabajo experimental, es posible estimar que no sería posible genotipificar poblaciones circulantes que estén bajo los 10 parásitos-equivalentes/mL. Considerando que un alto porcentaje de individuos con ECh crónica presenta cargas parasitarias bajo este límite de detección (Saavedra *et al.* 2016), un gran porcentaje de casos no podría ser genotipificado bajo las condiciones descritas en el presente trabajo. Es necesario, por tanto, realizar validación analítica de la técnica de qPCR para determinar la sensibilidad y especificidad analítica de los DTUs circulantes en Chile.

En el presente estudio, los mejores resultados se obtuvieron con la prueba de XD-qPCR, puesto que detectó más casos positivos en comparación con la muestra de sangre periférica amplificando con mayor frecuencia el DTU TcV, resultado concordante con lo descrito por Ortiz *et al.* (2015). Por otra parte, en los pacientes 8, 9 y 10 fue posible genotipificar simultáneamente, es decir en muestras de deyección y sangre periférica, los mismos DTUs. Sólo precisar que en el caso 9 el XD-qPCR detectó TcII y TcV y en sangre sólo fue posible genotipificar TcV. En cuanto a la cuantificación de las cargas parasitarias en XD-qPCR, la técnica arrojó rangos muy amplios, desde menos de 1 par.eq/mL hasta superar los 100.000 par.eq/mL.

La preferencia o afinidad por algunos de los DTU ha sido tendencia en varios tipos de estudios. En Venegas *et al.* (2013), se comparan los genotipos por análisis de microsatélites, entre *T. infestans* recolectados de la Región de Atacama, Valparaíso y Metropolitana, que resultaron diferentes a la sangre de pacientes crónicos y sus respectivos XD. Aunque, por la aparición de TcIII en esta última publicación, se infiere un problema en la clasificación de los DTUs. Igualmente, en un estudio de genotipificación por sondas de hibridación con muestras de sangre periférica y XD en *T. infestans*, presentan frecuencias diferenciales, el DTU TcI fue más frecuente en humanos y TcV en *T. infestans* (Coronado *et al.* 2006). En Ortiz *et al.* (2015), los DTUs de pacientes ECh con detección directa en sangre con sondas de hibridación se distribuyeron entre TcI, TcII, TcV y TcVI, en cambio los DTUs obtenidos por XD y cultivo axénico fueron únicamente TcV. Las diferencias entre humanos y triatominos representan la asociación de los hospederos con genotipos de *T. cruzi* (Coronado *et al.* 2006).

Con respecto a la preferencia de un DTU por parte de *T. infestans*, una explicación alternativa se refiere a que *T. infestans* reduce la composición de *T. cruzi* en cultivo axénicos y

la transmisión en el vector se asimila a la generación de una población clonal (Ortiz *et al.* 2015). Aunque en otros experimentos no se observa una tendencia de exclusión competitiva entre genotipos (da Silveira Pinto *et al.* 2000). Por otro lado, los clones del parásito se han adaptado diferencialmente en vertebrados e invertebrados (Coronado *et al.* 2006).

La técnica del XD ha sido una herramienta muy útil junto al PCR (Zulantay *et al.* 2011, Saavedra *et al.* 2013), utilizada a fin de multiplicar y observar *T. cruzi* viables en el tracto digestivo de *T. infestans*, también en la evaluación de pacientes en tratamiento con fármacos tripanocidas (Apt *et al.* 2019). No obstante, en el último tiempo el XD no ha sido incluido en la investigación desarrollada en Chile por el rechazo de algunos pacientes a la aplicación de esta técnica (Apt *et al.* 2019). Aunque el XD es antiguo, fue descrito en el año 1914 por Emile Brumpt, continúa siendo necesario para la experimentación e investigación, más que para diagnóstico clínico. Aunque son varios los aspectos limitantes a considerar con respecto al uso de vectores para amplificar tripomastigotes, por ejemplo, el difícil control la ingestión de sangre por parte de las vinchucas o muerte durante la incubación en el laboratorio (Schenone 1977, 1999; Saavedra *et al.* 2016).

En relación al uso del XD, una explicación alternativa, se podría encontrar en el hecho que los triatominos utilizados en Chile para XD hayan adquirido localmente un filtro que afecta la amplificación de DTUs por específico. Originalmente, la colonia de *T. infestans* en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile proviene de una muestra parental de vinchucas capturadas en la década del 1950 de diversas localidades de la Región de Coquimbo (Campos *et al.* 2007; Canals *et al.* 2016). Es probable que durante el proceso de captura junto a la reproducción de la colonia de *T. infestans* bajo condiciones de laboratorio durante estas

décadas hubiese afectado la diversidad genética a modo de efecto fundador. Ya han sido descritas diferencias genéticas y morfológicas entre muestras de triatomíneos silvestres, domésticos y colonias de laboratorio (Dujardin *et al.* 1999; Schofield *et al.* 1999; Catalá *et al.* 2001; Gómez-Sucerquia *et al.* 2009). En los estudios ya revisados acerca de la transmisibilidad vectorial se utilizaron colonias de *T. infestans* de Chile, Uruguay y Brasil, que entre sus resultados hubo mayor amplificación de TcI, seguido de TcV y TcII (de Lana *et al.* 1998; da Silveira Pinto *et al.* 1998, 2000). Aunque en estudios con cultivos de *T. cruzi* también hay selección de genotipos (Bosseno *et al.* 2000).

En relación con la diversidad de DTU, se ha podido observar que aparte de las particularidades ecológicas y epidemiológicas, los genotipos presentan diferencias biológicas y clínicas, transmisibilidad, virulencia y susceptibilidad a medicamentos (Andrade *et al.* 1985; Schaub 1989; Revollo *et al.* 1998; Toledo *et al.* 2004; Margioto *et al.* 2016). Se ha observado en trabajos experimentales que los genotipos clonales no se comportan de forma homogénea al comparar su transmisión vectorial en *T. infestans* (de Lana *et al.* 1998; Ortiz *et al.* 2015). Por ejemplo, en líneas clonales TcI, TcII y TcV³, fueron usadas para infectar experimentalmente ninfas de *T. infestans* que después de 30 días resultó en mayor transmisibilidad TcI, mientras que en TcV características intermedias y TcII presentó las características más bajas (de Lana *et al.* 1998). Considerando los mismos genotipos clonales, pero esta vez con pares mixtos (TcI+TcII, TcI+TcV, TcII+TcV), el comportamiento también difirió entre clones, pues los autores sugirieron una interacción entre los genotipos involucrados en la mezcla, en algunos casos inhibición o inhibición recíproca (da Silveira Pinto *et al.* 1998). Da Silveira Pinto *et al.* (2000), nuevamente con los mismos pares biclonales, por detección por sondas de hibridación,

³ Originalmente los genotipos clonales se denominaron 19/20, 32 y 39.

reportaron una eficiencia diferencial en la transmisión entre genotipos, sin una tendencia a que un genotipo eliminara a otro. También para evaluar la capacidad infectiva de líneas clonales cultivados *in vitro* en líneas celulares Vero, mostraron diferencias por distanciamiento filogenético, en que las formas tripomastigotes de TcI fueron más infectivas que TcII y TcV (Revollo *et al.* 1998).

La interacción y competencia de genotipos de *T. cruzi* también han sido descritos en vertebrados. Por ejemplo, Martins *et al.* (2006) infectaron roedores BALB/c con los genotipos TcI, TcII y TcV, a fin de evaluar las propiedades biológicas de *T. cruzi*. Se observó en estos hospederos, que en infecciones mixtas los genotipos no se comportan como infecciones monoclonales, sino presentaron diferencias significativas en mezclas filogenéticamente distantes (Martins *et al.* 2006). También en ratones infectados con clones de DTUs TcI, TcII y TcIV, difieren en su detección de acuerdo a la técnica de diagnóstico clínico usada en estudio, como el examen de sangre, hemocultivo, ELISA y PCR (Margioto *et al.* 2016). Por otra parte, en roedores silvestres de la especie *Octodon degus* infectados naturalmente, a los cuales se les aplicó XD en *T. infestans* y *M. spinolai* resultaron en susceptibilidad variable a líneas clonales de *T. cruzi*. El vector silvestre *M. spinolai* presentó mayor capacidad de hospedar y reproducir distintos genotipos de circulación local en comparación a *T. infestans* (Campos *et al.* 2007).

Los estudios anteriores son experimentales, con los cuales se debería tener cierta cautela al hacer extrapolaciones en patrones epidemiológicos (Revollo *et al.* 1998). Las técnicas de caracterización de *T. cruzi* son múltiples y variadas, que podrían haber tenido efectos en la detección de genotipos clonales (da Silveira Pinto *et al.* 1998, 2000). Si se trata de evaluar las implicancias metodológicas del XD, ya se había evidenciado como se alteraba la dinámica

poblacional de diferentes cepas del parásito dependiendo de la especie del vector, incluso distinguiendo entre triatomíneos silvestres y domésticos (Perlowagora-Szumlewicz *et al.* 1988, 1990; Campos *et al.* 2007). Por una parte, la causa se encontraría en el mismo vector, pues este insecto, en sí mismo es genéticamente heterogéneo e interfiere en su competencia vectorial (de Lana *et al.* 1998). Entonces la desventaja de utilizar triatomíneos axénicos es que podría haber afectado los resultados finales del experimento. A futuro, esto no debería ser razón para no utilizarlo, sino para comprender como el vector es un organismo con su propia historia co-evolutiva con *T. cruzi* en el continente americano.

Otra explicación metodológica para la baja cantidad de DTU en sangre y la alta frecuencia detectada para un DTU en comparación a otros, podría deberse a los problemas que rodean a las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos en PCR. Por una parte, la posibilidad de inhibidores presentes en la muestra que hayan afectado el desempeño de la PCR (Schijman 2018) o por la presencia de cepas con diferentes polimorfismos que no fueron analizados para los *partidores* utilizados (Muñoz-San Martín *et al.* 2017). Las amplificaciones no específicas reportadas, se podrían explicar por la circulación de otro genotipo, probablemente TcVI o una variante de TcI. El diseño de *partidores* utilizados contó con dos cepas de TcI: House 510 C8C3 para TcIa y Dm28c para TcIb basado en el polimorfismo del *SL-IR* (Muñoz-San Martín *et al.* 2017). De acuerdo a la distribución eco-epidemiológica de TcI en América, en Chile circulan los genotipos TcIa y TcIc, este último asociado al ciclo silvestre de los vectores *M. gajardoi* y *M. spinolai* (Cura *et al.* 2010). Así, la adición de más *partidores* específicos en qPCR hubiese aumentado la ocurrencia de infecciones mixtas. Por último, se debe tener en cuenta que la integridad del DNA parasitario presente en estas muestras se haya visto alterada debido a las distintas variables dependientes del almacenamiento y tratamiento de la muestra (Rozas-Marín

2018). Para el caso de las muestras de sangre, tomadas hace algunos años, la forma de preservación de éstas podría no ser el más óptimo, lo que requiere futuros estudios de evaluación (Zulantay *com. pers.*).

Podemos señalar que, si bien el XD es una excelente herramienta para estudiar los fenómenos observados, la principal limitación del presente estudio es el tamaño de muestra utilizada. En la actualidad, es muy difícil obtener muestras de deyecciones de ninfas de *T. infestans* alimentados mediante XD sobre pacientes con ECh. Se ha sugerido utilizar el XD artificial, que permite alimentar en forma indirecta al vector con sangre del individuo en estudio, en condiciones de laboratorio. Otra limitación es la sensibilidad de PCR en tiempo real en muestras de sangre con baja carga parasitaria. Para alcanzar el máximo potencial del método se recomienda incluir más DTUs al ensayo de amplificación.

Las diferentes especies de vectores triatominos presentan una distribución geográfica en nichos y hospederos a los cuales se han adaptado (Gaunt y Miles 2000; Zingales *et al.* 2012), que a su vez están insertos en un complejo entramado de ciclos de transmisión hospedero-vector-parásito, donde son recurrentes géneros de mamíferos reservorios y linajes de *T. cruzi*. En el territorio de Chile los vectores triatominos, animales silvestres y domésticos conocidos presentan frecuencias diferenciales de infección con *T. cruzi*, con variaciones espaciales y temporales (Ihle-Soto *et al.* 2019; Correa *et al.* 2020), manteniendo así el reservorio del parásito (Rozas *et al.* 2005; Botto Mahan *et al.* 2015; Campos-Soto *et al.* 2016). En el roedor *O. degus*, muy abundante en el ecosistema semiárido, se ha reportado con mayor probabilidad el DTU TcI de *T. cruzi*, aunque en otros roedores silvestres y *Carpra hircus* de la Región de

Coquimbo no se observa una preferencia o especificidad de DTU por alguna especie (Rozas *et al.* 2007).

En una síntesis ecoepidemiológica, considerando diversos animales y triatominos a los cuales se les ha logrado hacer genotipificación, se ha observado que no comparten las mismas frecuencias de DTUs. Según las últimas detecciones con qPCR en pacientes con ECh crónica de Chile, los DTUs circulantes de mayor a menor frecuencia son TcI, TcII, TcV y TcVI (Carrasco y Fuentealba 2017; Muñoz-San Martín *et al.* 2017, 2018). Entonces, ¿Por qué se obtiene una frecuencia significativa del DTU TcV en XD de triatominos axénicos? Teniendo en cuenta los antecedentes anteriores con XD se ha sugerido que el vector, en este caso *T. infestans* selecciona, filtra o presenta preferencia por un DTU (Ortiz *et al.* 2005), desconociéndose hasta ahora el mecanismo. Por otro lado, los DTUs estarían interactuando en forma competitiva (Coronado *et al.* 2006). Al parecer, experimentos con triatominos axénicos no son un reflejo de los patrones de DTUs de los ciclos de transmisión de todos los hospederos del ecosistema semiárido de Chile. En cambio, se estarían detectando más frecuentemente aquellos DTUs circulantes que han co-evolucionado en *T. infestans* como especie. La co-evolución es frecuente en interacciones de parasitismo y ciertamente hay casos en los cuales hospedero y parásito conducen a evolución recíproca (Begon *et al.* 2006). Como ya se ha visto en muestras de un mismo caso, el TcV ausente en sangre y positivo en el vector axénico indicaría que este DTU ya estaba presente en el paciente, en muy baja carga parasitaria y que posteriormente fue amplificado por una adaptación recíproca, lo que permite proyectar futuros estudios.

Triatoma infestans es una especie de aparición reciente, ampliamente distribuido por variadas zonas geográficas, que habita siete países de Sudamérica aparentemente por las

migraciones de los últimos 100 años (Schofield 1988). De acuerdo a investigaciones genéticas se ha postulado que hay dos grandes linajes evolutivos: un linaje andino y no-andino, más un tercer linaje “intermedio” (Panzera *et al.* 2014). Consecuentemente con dos hipótesis de origen, una que postula su origen en los valles del centro de Bolivia (Schofield 2000; Panzera *et al.* 2014) y de la zona baja subtropical del Gran Chaco (Carcavallo 1998). Concordantemente, TcV y TcVI son genotipos frecuentes en la zona sur de Sudamérica, que circulan en el ciclo de transmisión doméstico, por ejemplo humanos, perros, vinchucas, y escasamente se encuentra en ciclos selváticos (Brenière *et al.* 2016), y habrán emergido por al menos dos eventos de hibridación entre TcII y TcIII (Westenberg *et al.* 2005; Tomasini y Diosque 2015). Tienen su probable origen en la zona del Chaco y valles andinos adyacentes (Lewis *et al.* 2011). Se estima que estos dos genotipos surgieron hace menos de 60.000; sin embargo, se fijaron en el ciclo doméstico por un evento de deriva génica tipo “cuello de botella” a partir de aquellos de *T. infestans* que se congregaron alrededor del domicilio y peridomicilio de poblaciones prehispanicas (Lewis *et al.* 2011). Para Usinger *et al.* (1966), el acercamiento de *T. infestans* podría haberse producido hacia el 5.000 A.C. como consecuencia de la domesticación de cuyes silvestres (similar a *Cavia tschudii*) entre las tribus andinas de Bolivia, Perú y Chile. La hipótesis de una intervención antropogénica parece plausible, no obstante, faltan evidencias de tipo arqueológicas y la comparación de filogenias. Por tanto, se debería mantener cautela mientras no se hayan realizado estos estudios.

A modo de cierre del presente trabajo, se puede decir que la afinidad de los triatomos de Chile por alguno de los DTU todavía es una pregunta sin respuesta, por lo que se requieren futuras investigaciones para resolver dichas interrogantes. Este estudio ha podido

detectar que a partir de dos muestras biológicas tomadas en forma paralela, se obtienen diferentes perfiles de DTUs de *T. cruzi*.

CONCLUSIONES

- El XD no sólo multiplica *T. cruzi*, sino que también podría actuar como un filtro biológico en relación a los diferentes DTUs que circulan en la sangre de un individuo infectado.
- El DTU TcV es el más frecuentemente aislado en muestras de deyección obtenidas mediante cultivo axénico en XD. Las causas acerca de esta afinidad son desconocidas, aunque parecen estar vinculadas a un proceso de co-evolución.
- Las muestras de sangre representan la diversidad de DTUs de *T. cruzi* que circulan en pacientes con enfermedad de Chagas del ecosistema semiárido de Chile, en cambio al utilizar *T. infestans* se amplifican los DTUs del humano más afines a los triatomíneos. Sugerimos que esta particular observación en la relación parásito-vector se podrían deber a procesos filogeográficos y de co-evolución.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Andrade, S.G. 1985. Morphological and behavioral characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18 (Suppl), 39-46.
- Armesto, J., Arroyo, M. e Hinojosa Opazo, L. 2007. The Mediterranean environment of Central Chile. En: Veblen, Thomas T.; Young, Kenneth R.; Orme, Antony R., (eds). *The physical geography of South America*. pp 184-199. Oxford University Press.
- Arnaud-Haond, S., Moalic, Y., Barnabé, C., Ayala, F.J. y Tibayrenc, M. 2014. Discriminating micropathogen lineages and their reticulate evolution through graph theory-based network analysis: the case of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *PLoS ONE* 9(8), e103213.
- Apt, W. 2013. Tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas). En: W. Apt. (ed), *Parasitología Humana*. pp 282-297. MacGraw Hill, México.
- Apt, W., Arribada, A., Zulantay, I., Saavedra, M., Araya, E., Solari, A., Ortiz, S., Arriagada, K. y Rodríguez, J. 2015. *Trypanosoma cruzi* burden, genotypes, and clinical evaluation of Chilean patients with chronic Chagas cardiopathy. *Parasitology Research* 114(8), 3007-3018.
- Apt, W., Carrasco, D., Fuentealba, C., Canals, M., Muñoz, G., Saavedra, M., Castillo, J.P. y Zulantay, I. 2019. Chronic Chagas disease: Quantification of *Trypanosoma cruzi* in peripheral blood and dejections of *Triatoma infestans* fed by xenodiagnosis in patients with and without cardiopathy. *Acta Tropica* 200, 105167.
- Aufderheide, A., Salo, W., Madden, M., Streit, J., Buikstra, J. Gühl, F. Arriaza, B., Renier, C. Lorentz, E., Wittmers, L., Fornaciari, G. y Allison, M. 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Science* 101(7), 2034-2039.
- Bacigalupo, A., Segovia, V., García, A., Botto-Mahan, C., Ortiz, S., Solari, A. Acuña-Retamar, M., Torres-Pérez F. y Cattán, P. 2012. Differential pattern of infection of sylvatic nymphs and domiciliary adults of *Triatoma infestans* with *Trypanosoma cruzi* genotypes in Chile. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87(3), 473-480.
- Bacigalupo, A., Correa, J. P., García, A., & Cattán, P. E. 2015. Focos silvestres de *Triatoma infestans* en Latinoamérica: análisis y perspectivas para Chile. *Parasitología Latinoamericana* 64(3), 27-35.
- Barnabé, C., De Meeûs, T., Noireau, F., Bosseno, M.F., Monje, E. M., Renaud, F. y Brenière, S.F. 2011. *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs): microsatellite loci and population

genetics of DTUs TcV and TcI in Bolivia and Peru. *Infection, Genetics and Evolution* 11(7), 1752-1760.

Begon, M., Townsend, C.R. y Harper, J.L. 2006. Parasitism and Disease. En: *Ecology: from individuals to ecosystems* (eds). Pp 347-380. Cuarta edición. Blackwell Publishing.

Benítez, R., Renzo, I., Catalán, P. y Avilés, C. 2012. Profilaxis de enfermedad de Chagas en niños y adultos sometidos a trasplante de órganos sólidos y de precursores hematopoyéticos. *Revista Chilena de Infectología* 29, 41-43.

Bern, C., Messenger, L. A., Whitman, J. D., & Maguire, J. H. (2019). Chagas disease in the United States: a public health approach. *Clinical microbiology reviews*, 33(1).

Bizai, M.L., Peralta, R., Simonetto, S., Olivera, L.V., Arias, E., Dalla Costa, J., Manattini, S., Sione, W., Fabbro, D. y Diez, C. 2020. Geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes detected in chronic infected people from Argentina: Association with climatic variables and clinical manifestations of Chagas disease. *Infection, Genetics and Evolution* 78, 104-128.

Botto-Mahan, C., Cattán, P.E., Canals, M. y Acuña, M. 2005. Seasonal variation in the home range and host availability of the blood-sucking insect *Mepraia spinolai* in wild environment. *Acta Tropica* 95(2), 160-163.

Bosseno, M., Yacsik, N., Vargas, F. y Brenière, S. 2000. Selection of *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes (Clonet 20 and 39) isolated from Bolivian Triatomines following subculture in liquid medium. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95(5), 601-607.

Brenière, S.F., Waleckx, E. y Barnabe, C. 2016. Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into discrete typing units (DTUs): attempt at an inventory. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10(8), e0004792.

Britto, C.C. 2009. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 Suppl. 1, 122-135.

Briceño-León, R. 2003. Las ciencias sociales y la salud: un diverso y mutante campo teórico. *Ciência & Saúde Colectiva* 8, 33-45.

Brumpt, É. 1914. Le Xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomose de Chagas. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 7(10), 706-710.

Campos, R., Acuna-Retamar, M., Botto-Mahan, C., Ortiz, S., Cattán, P.E. y Solari, A. 2007. Susceptibility of *Mepraia spinolai* and *Triatoma infestans* to different *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected rodent hosts. *Acta Tropica* 104(1), 25-29.

Campos-Soto, R., Ortiz, S., Cordova, I., Bruneau, N. Botto-Mahan C. y Solari, A. 2016. Interactions between *Trypanosoma cruzi* the Chagas disease parasite and naturally infected wild *Mepraia* vectors of Chile. *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 16 (3), 165-171.

Canals, M., Cruzat, L., Molina, M.C, Ferreira, A. y Cattán, P.E. 2001. Blood host sources of *Mepraia spinolai* (Heteroptera: Reduviidae), wild vector of Chagas disease in Chile. *Journal of Medical Entomology* 38(2), 303–307.

Canals, M., Alvarado, S., Cáceres, D. y Cattán, P.E. 2016. Twenty years of monitoring of mortality and fecundity of *Triatoma infestans* in the laboratory. *Parasitología Latinoamericana* 65(2), 54-60.

Canals, M., González, C., Canals, L., Canals, A., Cáceres, D., Alvarado, S., Cattán, P., Saavedra, M., Zulantay, I. y Apt, W. 2017. ¿Qué dicen los números de la evolución temporal de la enfermedad de Chagas? *Revista Chilena de Infectología* 34(2), 120-127.

Canals, M.L., Cifuentes, A.C., Ayala, S., Tapia-Garay, V. y Lillo, D.C. 2018. Eco-Epidemiology of Chagas Disease in Chile. En: V. Nissapatorn y H.S. Oz (eds) *Chagas Disease: Basic Investigations and Challenges*. pp 73-94. IntechOpen.

Carcavallo, R.U. 1998. Phylogeny of triatominae. The *Triatoma infestans* complex. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 93, 68-70.

Carrasco, D. y Fuentealba, C. 2017. Genotipificación de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR tiempo real en individuos con enfermedad de Chagas crónica sometidos a tratamiento quimioterapéutico. Tesis Profesional para optar al Título de Tecnólogo Médico con Mención en Bioanálisis Clínico Molecular, Hematología y Medicina Transfusional. Universidad de Chile.

Catalá, S. y Dujardin, J.P. 2001. Antennal sensilla patterns indicate geographic and ecotopic variability among *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations. *Journal of Medical Entomology* 38(3), 423-428.

Centers for Disease Control and Prevention. Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

Chacón, F., Bacigalupo, A., Quiroga, J.F., Ferreira, A., Cattán, P.E. y Ramírez-Tolosa, G. 2016. Feeding profile of *Mepraia spinolai*, a sylvatic vector of Chagas disease in Chile. *Acta Tropica* 162, 171-173.

Coronado, X., Zulantay, I., Albrecht, H., Rozas, M., Apt, W., Ortiz, S., Rodríguez, J., Sánchez, G. y Solari, A. 2006. Variation in *Trypanosoma cruzi* clonal composition detected in blood patients and xenodiagnosis triatomines: implications in the molecular epidemiology of Chile. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 74(6), 1008-1012.

Cura, C.I., Mejía-Jaramillo, A.M., Duffy, T., Burgos, J.M., Rodriguero, M., Cardinal, M.V., Kjos, S., Gurgel-Gonçalves, R., Blanchet, D., de Pablos, L.M., Tomasini, N., da Silva, A., Russomando, G., Cuba Cuba, C.A., Aznar, C., Abate, T., Levina, M.J., Osuna, A. y Schijman A.G. 2010. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographic regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced leader genes. *International Journal of Parasitology* 40, 1599-1607.

Cura, C., Lucero, R., Bisio, M., Oshiro, E., Formichelli, L., Burgos, J. y Schijman, A. 2012. *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitology* 139(4), 516-521.

Cura, C. I., Duffy, T., Lucero, R. H., Bisio, M., Péneau, J., Jimenez-Coello, M., Calabuig, E., Gimenez, M.J., Valencia Ayala, E., Kjos, S.A., Santalla, J., Mahaney, S.M, Cayo, N.M., Nagel, C., Barcán, L., Málaga Machaca, E.S., Acosta Viana, K.Y., Brutus, L., Ocampo, S.B., Aznar, C., Cuba Cuba. C.A., Gürtler, R.E., Ramsey, J. M., Ribeiro, I., VandeBerg, J.L., Yadon, Z.E., Osuna, A. y Schijman, A. 2015. Multiplex real-time PCR assay using TaqMan probes for the identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in biological and clinical samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9(5), e00033765.

Da Silveira Pinto, A., de Lana, M., Bastrenta, B., Barbabé, C., Quesney, V., Noël, S. y Tibayrenc 1998. Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. *Parasitology Research* 84(5), 348-353.

Da Silveira Pinto, A., de Lana, M., Britto, C., Bastrenta, B. y Tibayrenc, M. 2000. Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. *International Journal of Parasitology* 30(7), 843-848.

De Lana, M., da Silveira Pinto, A., Barnabé, C., Quesney, V., Noël, S. y Tibayrenc, M. 1998. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology* 90(1), 20-25.

Dias Pinto, J.C. 2012. Tendencias sociales de la enfermedad de Chagas para las próximas décadas. *Salud Colectiva* 8, 39-48.

Dias, J.C. y Schofield, C.J. 2017. Social and medical aspects on Chagas disease management and control. En: J. Telleria y M. Tibayrenc (eds). *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research*. Segunda Edición. pp. 47-57. Elsevier.

Dorn, P.L., McClure, A.G., Gallaspy, M.D., Waleckx, E., Woods, A.S., Monroy, M.C. y Stevens L. 2017. The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia. PLoS Neglected Tropical Diseases 11(9): e0005878.

Dujardin, J.P., Steindel, M., Chávez, T., Machane, M. y Schofield, C. 1999. Changes in the sexual dimorphism of Triatominae in the transition from natural to artificial habitats. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94, 565-569.

Freitas, J.M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J.R., Bastos-Rodrigues, L., Gonçalves, V.F., Teixeira, S.M., Chiari, E., Junqueira, A.C.V., Fernandes, O., Macedo, A.M., Machado, C.R. y Pena, S.D.J. 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathogens 2(3), e24.

Gaunt, M., y Miles, M. 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 95(4), 557-565.

Gómez-Sucerquia, L.J., Triana-Chávez, O. y Jaramillo-Ocampo, N. 2009. Quantification of the genetic change in the transition of *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 (Hemiptera: Reduviidae) from field to laboratory. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104(6), 871-877.

Gühl, F., Jaramillo, C., Vallejo, G., Yockteng, R., Cárdenas Arroyo, F., Fornaciari, G. Arriaza, B. y Aufderheide, A. 1999. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-Year-Old Mummified human tissue from Northern Chile. American Journal of Physical Anthropology 108, 400-407.

Gühl, F. y Ramírez, J.D. 2011. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision? Acta Tropica 119, 1-4.

Gühl, F., Aufderheide, A. y Ramírez, J.D. 2014. From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas. International Journal of Parasitology 44(9), 605-612.

Hernández, C., Cucunubá, Z., Flórez, C., Olivera, M., Valencia, C., Zambrano, P., León, C. y Ramírez, J.D. 2016. Molecular diagnosis of Chagas disease in Colombia: parasitic loads and discrete typing units in patients from acute and chronic phases. PLoS Neglected Tropical Diseases 10(9), e0004997.

Herrera, C., Barges, M.D., Fajardo, A., Montilla, M., Triana, O., Vallejo, G.A. y Gühl, F. 2007. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. Infection, Genetics and Evolution 7, 535-539.

Ihle-Soto, C., Costoya, E., Correa, J.P., Bacigalupo, A., Cornejo-Villar, B., Estadella, V., Solari, A., Ortiz, S., Hernández, H.J., Botto-Mahan, C., Gorla, D.E. y Cattán, P.E. 2019. Spatio-temporal characterization of *Trypanosoma cruzi* infection and discrete typing units infecting hosts and vectors from nondomestic foci of Chile. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(2), e0007170.

Lewis, M.D., Llewellyn, M.S., Yeo, M., Acosta, N., Gaunt, M.W. y Miles, M.A. 2011. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(10), e1363.

Lidani, K.C.F., Andrade, F.A., Bavia, L., Damasceno, F.S., Beltrame, M.H., Messias-Reason, I.J. y Sandri, T.L. 2019. Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. *Frontiers in Public Health* 7, 166.

Lucero, R.H., Brusés, B.L., Cura, C.I., Formichelli, L.B., Juiz, N., Fernández, G.J., Bisio, M., Deluca, G.D., Besuchio, S., Hernández, B.O. y Schijman, A.G. 2016. Chagas' disease in Aboriginal and Creole communities from the Gran Chaco Region of Argentina: Seroprevalence and molecular parasitological characterization. *Infection, Genetics and Evolution* 41, 84-92.

Marcili, A., Lima, L., Valente, V.C., Valente, S.A., Batista, J.S., Junqueira, A.C., Souza, A.I., da Rosa, J.A., Campaner, M., Lewis, M.D., Llewellyn, M.S., Miles, M.A. y Teixeira, M.M. 2009. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infection, Genetics and Evolution* 9(6), 1265-1274.

Margioto, A.P., de Abreu, A.P., Gruending, A.P., Bahia, M.T., Gomes, M.L., Marqués de Araújo, S. y Ornelas, J.M. 2016. Differential parasitological, molecular, and serological detection of *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV in blood of experimentally infected mice. *Experimental Parasitology* 166, 44-50.

Martins, H.R., Toledo, M.J., Veloso, V.M., Carneiro, C.M., Machado-Coelho, G.L., Tafuri, W.L., Bahia, M.T., Valadares, H.M., Macedo, A.M. y Lana, M. 2006. *Trypanosoma cruzi*: impact of dual-clone infections on parasite biological properties in BALB/c mice. *Experimental Parasitology* 112, 237-246.

Miles, M.A., Souza, A., Povoá, M., Shaw, J.J., Lainson, R. y Toyé, P.J. 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272(5656), 819-821.

Miles, M.A., Llewellyn, M.S., Lewis, M.D. y Yeo, M. 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. *Parasitology* 136, 1509-1528.

Ministerio de Salud (MINSAL). 2014. Norma general técnica control y prevención nacional de la Enfermedad de Chagas. Febrero. Chile. Disponible en: https://www.minsal.cl/sites/default/files/NORMA%20TECNICA_CHAGAS_FINAL.pdf

Ministerio de Salud (MINSAL). 2016. Informe Programa Nacional Integral de Enfermedad de Chagas, Julio. Disponible en <http://epi.minsal.cl/chagas-materiales-relacionados/>

Montecinos, S., Gutiérrez, J.R., López-Cortés, F. y López, D. 2016. Climatic characteristics of the semi-arid Coquimbo Region in Chile. *Journal of Arid Environments* 126, 7-11.

Muñoz-San Martín, C., Apt, W. y Zulantay, I. 2017. Real-time PCR strategy for the identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units directly in chronically infected human blood. *Infection, Genetics and Evolution* 49, 300-308.

Muñoz-San Martín, C., Zulantay, I., Saavedra, M., Fuentealba, C., Muñoz, G. y Apt, W. 2018. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* detected by real-time PCR in Chilean patients with chronic Chagas cardiomyopathy. *Acta Tropica* 185, 280-284.

Organización Mundial de la Salud. 2000. Chagas disease, Chile: Certification of interruption of transmission. *Weekly Epidemiological Record* 75 (02), 10-12.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. Weekly Epidemiology Report. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Switzerland. En: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/242316/WER9006_33-44.PDF?sequence=1&isAllowed=y

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2020. Nota descriptiva. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Actualizada el 11 de marzo del 2020. En: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

Organización Panamericana de Salud (OPS) 2016. Enfermedades infecciosas desatendidas en las Américas: Historias de éxito e innovación para llegar a los más necesitados. Washington, DC. En: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/31399>

Ortiz, S., Zulantay, I., Apt, W., Saavedra, M. y Solari, A. 2015. Transferability of *Trypanosoma cruzi* from mixed human host infection to *Triatoma infestans* and from insect to axenic culture. *Parasitology International* 64(1), 33-36.

Ortiz, S., Ceballos, M.J., González, C.R., Reyes, C., Gómez, V., García, A. y Solari, A. 2016. *Trypanosoma cruzi* diversity in infected dogs from areas of the north coast of Chile. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 5, 42-47.

Panzer, F., Ferreiro, M.J., Pita, S., Calleros, L., Pérez, R., Basmadján, Y., Guevara, Y., Brenière, S.F. y Panzer, Y. 2014. Evolutionary and dispersal history of *Triatoma infestans*, main vector of Chagas disease, by chromosomal markers. *Infection, Genetics and Evolution* 27, 105-113.

Perlowagora-Szumlewicz, A., Muller, C.A. y de Carvalho Moreira, C.J. 1988. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 3, On the interaction of vector species and parasite strains in the reaction of bugs to infection by *Trypanosoma cruzi*. *Revista de Saúde Pública* 22, 390-400.

Perlowagora-Szumlewicz, A., Muller, C.A. y de Carvalho Moreira, C.J. 1990. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 4. The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. *Revista Saúde Pública* 24, 165-177.

Ramírez, J.D., Duque, M. C., Montilla, M., Cucunubá, Z. y Gühl, F. 2012. Natural and emergent *Trypanosoma cruzi* I genotypes revealed by mitochondrial (Cytb) and nuclear (SSU rDNA) genetic markers. *Experimental Parasitology* 132(4), 487-494.

Rassi, Jr. A., Rassi, A. y Marin-Neto, J.A. 2010. Chagas disease. *Lancet* 375(9723), 1388-1402.

Revollo, S., Oury, B., Laurent, J.-P., Barnabé, C., Quesney, V., Carrière, V., Noël, S. y Tibayrenc, M. 1998. *Trypanosoma cruzi*: Impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Experimental Parasitology* 89, 30-39.

Reyes, R., Yohannessen, K., Ayala, S. y Canals, M. 2019. Estimaciones de la distribución espacial del riesgo relativo de mortalidad por las principales zoonosis en Chile: enfermedad de Chagas, hidatidosis, síndrome cardiopulmonar por hantavirus y leptospirosis. *Revista Chilena de Infectología* 36(5), 599-606.

Rozas, M., Botto-Mahan, C., Coronado, X., Ortiz, S., Cattán P.E. y Solari, A. 2007. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 647-653.

Rozas Marín, T. 2018. Caracterización de DTUs de *Trypanosoma cruzi* en individuos chagásicos crónicos chilenos mediante la técnica de PCR tiempo real. Tesis profesional para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con Mención en Bioanálisis Clínico Molecular, Hematología y Medicina Transfusional.

Sandoval-Rodríguez, A., Rojo, G., López, A., Ortiz, S., Saavedra, M., Botto-Mahan, C., Cattán, P. y Solari, A. 2019. Comparing vector competence of *Mepraia gajardoi* and *Triatoma infestans* by genotyping *Trypanosoma cruzi* discrete typing units present in naturally infected *Octodon degus*. *Acta Tropica* 190, 119-122.

Saavedra, M., Zulantay, I., Apt, W., Castillo, J., Araya, E., Martínez, G. y Rodríguez, J. 2016. Quantification by real-time PCR of *Trypanosoma cruzi* DNA in samples of *Triatoma infestans* used in xenodiagnosis of chronic Chagas disease patients. *Parasites & Vectors* 9(1), 382.

Schaub, G.A. 1989. *Trypanosoma cruzi*: quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Experimental Parasitology* 68, 260–273.

Schenone, H., Rojo, M. y Concha, L. 1977. Positividad diurna y nocturna del xenodiagnóstico en un paciente con infección chagásica crónica de parasitemia permanente. *Boletín Chileno de Parasitología* 32, 63-66.

Schenone, H. 1999. Xenodiagnosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94, 289-294.

Schijman, A.G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Jaramillo, A.M.M., Cura, C., Auter, F., Veron, V., Qvarnstrom, Y., Deborggraeve, S., Hajar, 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., Jercic, 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. y Ladzins, J. 2011. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(1), e931.

Schijman, A. G. 2018. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 184, 59-66.

Schofield, C. J. 1988. The biosystematics of Triatominae. In: *Biosystematics of Haematophagous Insects* (M. W. Service, ed.), pp. 284-312, special volume 37, Oxford: Systematics Association/ Clarendon Press.

Schofield, C.J. 2000. Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cadernos de Saúde Pública* 16, S89-S92.

Schofield, C.J., Diotaiuti, L. y Dujardin, J.P. 1999. The process of domestication in triatominae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94(Suppl. 1), 375-378.

Stanaway, J.D. y Roth, G. 2015. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. *Global Heart* 10(3), 139-144.

Storino, R. 2013. Aspectos sociales de las parasitosis. pp 114-139. En: W. Apt. (ed), *Parasitología Humana*. MacGraw Hill, México.

Sturm, N.R. y Campbell, D.A. 2010. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 115, 35-43.

Tibayrenc, M., y Ayala, F.J. 1988. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution* 42(2), 277-292.

Toledo, M.J.D.O., Bahia, M.T., Veloso, V.M., Carneiro, C.M., Machado-Coelho, G.L.L., Alves, C.F., Martins, H.R., Cruz, R.E., Tafuri, W.L. y Lana, M.D. 2004. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(6), 1045-1053.

Tomasini, N., y Diosque, P. 2015. Evolution of *Trypanosoma cruzi*: clarifying hybridizations, mitochondrial introgressions and phylogenetic relationships between major lineages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 110(3), 403-413.

Torres, J.P., Ortiz, S., Muñoz, S. y Solari, A. 2004. *Trypanosoma cruzi* isolates from Chile are heterogeneous and composed of mixed populations when characterized by schizodeme and Southern analyses. *Parasitology* 128, 161-168.

Toso, A., Vial, F. y Galanti, N. 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista Médica de Chile* 139(2), 258-266.

Usinger, R.L., Wygodzinsky, P. y Ryckman, R.E. 1966. The biosystematics of Triatominae. *Annual Review of Entomology* 11(1), 309-330.

Venegas, J., Díaz, F., Rojas, T., Miranda, S., Jercic, M.I., González, C., Coñoeapan, W., Vargas, A., Pichihuanes, S., Gajardo, M., Rodríguez, J. y Sánchez, G. 2013. Microsatellite loci-based distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes from Chilean chronic Chagas disease patients and *Triatoma infestans* is concordant with a specific host-parasite association hypothesis. *Acta Parasitologica* 58(2), 139-148.

Westenberger, S.J., Barnabé, C., Campbell, D.A. y Sturm, N.R. 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171, 527-543.

Zafra, G., Mantilla, J.C., Valadares, H.M., Macedo, A.M. y González, C.I. 2008. Evidence of *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombian chagasic patients. *Parasitology Research* 103, 731-734.

Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Gühl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M. y Schijman, A.G. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature:

second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 104, 1051-1054.

Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M., Schijman, A.G, Llewellyn, M.S., Lages-Silva, E., Machado, C.R., Andrade, S.G. y Sturm, N.R. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infection, Genetics and Evolution 12(2), 240-253.

Zingales, B. 2018. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. Acta Tropica 184, 38-52.

Zulantay, I., Apt, W., Valencia, C., Torres, A., Saavedra, M., Rodríguez, J., Sandoval, L., Martínez, G., Thieme, P. y Sepúlveda, E. 2011. Detection of *Trypanosoma cruzi* in untreated chronic chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66(10), 2224-2226.

Zulantay, I., Apt, W., Ramos, D., Godoy, L., Valencia, C., Molina, M., Sepúlveda, E., Thieme, P., Martínez, G. y Corral, G. 2013. The epidemiological relevance of family study in Chagas disease. PLoS Neglected Tropical Diseases 7(2), e1959.