

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE *TRYPANOSOMA*
CRUZI CIRCULANTES EN TRES ZONAS DE BUCARAMANGA**

JENNY ALEXANDRA PINTO GOMEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA
2016**

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* CIRCULANTES EN TRES ZONAS DE BUCARAMANGA

JENNY ALEXANDRA PINTO GOMEZ

**Trabajo de Grado para optar al título de
Magister en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Directora:
CLARA ISABEL GONZÁLEZ RUGELES, *PhD***

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA
2016**

Agradecimientos

A la Dra Clara, por sus invaluable enseñanzas académicas y de la vida.

Al Dr Gerardo, por su acompañamiento y confianza.

A mi familia, por su amor, apoyo, comprensión y respaldo.

A mis sobrinos, por las innumerables enseñanzas que me brindan cada día.

A mis amigos de la maestría, a mis amigos del laboratorio y a mis amigos de la vida por estar ahí con la palabra y el consejo adecuado.

A todos aquellos de quienes pude aprender algo en este camino recorrido.

A ellas, siempre en estas letras y siempre en mi memoria.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	15
1.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	15
1.2. <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	16
1.2.1. Ciclo de vida	17
1.2.2. Ciclos de transmisión	18
1.3. PRINCIPALES RESERVORIOS DE <i>T. CRUZI</i>	21
1.3.1. <i>Didelphis sp</i>	21
1.3.2. Armadillos	24
1.3.3. Roedores	24
1.4. EL VECTOR	25
1.4.1. Ciclo de vida	26
1.4.2. Comportamiento biológico	27
1.4.3. Vectores de importancia en Colombia	28
1.5. FASES CLINICAS	29
1.6. VÍAS DE TRANSMISIÓN DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	30
1.7. PATOGENIA	31
1.8. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	31
1.9. TRATAMIENTO	34
1.10. GENOMA	34
1.11. DIVERSIDAD GENÉTICA DE <i>T. CRUZI</i> Y CLASIFICACIÓN	35
1.12. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA	41
1.12.1 Detección molecular de <i>T. cruzi</i>	41
1.12.2. Marcadores asignación DTU	42
2. JUSTIFICACIÓN	44
3. OBJETIVOS	45
4. MATERIALES Y MÉTODOS	46

4.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO	47
4.2.1 Humanos	47
4.2.2 Reservorios	48
4.2.3. Triatominos	48
4.3. AISLAMIENTO DEL PARÁSITO	49
4.3.1. Hemocultivo	49
4.3.2. Cultivo para el aislamiento del parásito a partir de heces de triatomino	50
4.4. Clonación de los aislados	50
4.6. DETECCIÓN DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	51
4.8. SECUENCIACIÓN	53
4.9. CONSIDERACIONES ÉTICAS	54
5. RESULTADOS	55
5.1 POBLACIÓN HUMANA	55
5.2 RESERVORIOS	56
5.3 VECTORES	58
6. DISCUSIÓN	62
7. CONCLUSIONES	72
8. RECOMENDACIONES	73
BIBLIOGRAFÍA	74

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Listado de los genotipos identificados por Herrera de acuerdo al motivo (GT) _n (ATGT) _n (AT) _n (GT) _n .	40
Tabla 2. Tamaño del amplificado de los marcadores y asignación de DTU.	43
Tabla 3: Condiciones PCR marcadores empleados.	53
Tabla 4 Distribución por edad, individuos muestreados.	55
Tabla 5. <i>Didelphis marsupialis</i> capturados en el estudio.	56
Tabla 6. Área y número de triatominos capturados.	59
Tabla 7. Análisis triatominos capturados con vida.	59

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Taxonomía de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 2. Estadios de <i>T. cruzi</i> .	17
Figura 3. Ciclos de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	18
Figura 4. Ciclos de transmisión de <i>T.cruzi</i>	20
Figura 5. Distribución geográfica aproximada de las DTU de <i>T.cruzi</i> a nivel selvático y doméstico	39
Figura 6. Distribución de los genotipos estudiados por Herrera en Colombia	28
Figura 7. Áreas de estudio	47
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% PCR-TCZ	56
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% PCR-TCZ.	57
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% PCR mini-exón en muestras TCZ positivas.	57
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2% PCR mini-exón clones.	58
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2% PCR-TCZ.	60
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2% PCR mini-exón clones.	60
Figura 14. Secuencias Motivo micro satélite, región intergénica gen mini- exón.	61

TITULO: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE AISLADOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* CIRCULANTES EN TRES ZONAS DE BUCARAMANGA*

AUTORES: PINTO GÓMEZ Jenny Alexandra; GONZÁLEZ RUGELES Clara Isabel **.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Reservorios, DTU, Triatomíneos.

RESUMEN

En Colombia, el departamento de Santander registra el mayor número de brotes de Chagas agudo con probable transmisión oral, incluida su capital, la ciudad de Bucaramanga. En el presente estudio se adelantó la búsqueda, en tres áreas periurbanas de Bucaramanga, de infección con *Trypanosoma cruzi* en humanos, reservorios y vectores. Estas áreas presentan ecotopos similares a los lugares donde ocurrieron los brotes.

La infección en muestras humanas se determinó mediante métodos serológicos, parasitológicos y moleculares y en el caso de reservorios y vectores mediante métodos parasitológicos y moleculares. La seroprevalencia en humanos fue de 2,7%, sin embargo los hemocultivos y amplificación por PCR fueron negativos en estos individuos.

Didelphis marsupialis fue el único reservorio silvestre periurbano capturado y el 32% estaba infectado con *T. cruzi*. El hemocultivo fue positivo en 6/25 muestras y la amplificación por PCR en 8/25. La Unidad Discreta de tipificación DTUI, fue identificada en todos los aislados utilizando los marcadores SL-IR, 24S α y 18rRNA. El genotipo intra-DTU G2 fue determinado en 5/6 y G11 en 1/6, al analizar el motivo microsatélite del gen mini-exon.

Los vectores capturados pertenecían a las especies *Rhodnius pallescens* y *Panstrongilus geniculatus*. Se detectó *T. cruzi* mediante PCR en 5/8 muestras y se obtuvieron aislados en 2/8 muestras, identificándose el parásito como DTUI y genotipo intra-DTU G2. Todos los triatomíneos se capturaron al interior de las viviendas como especies intrusas.

Los hallazgos permiten concluir que en el área existe la presencia de reservorios periurbanos y vectores infectados, siendo el principal reservorio *D. marsupialis*. Los vectores podrían estar viviendo próximos a los reservorios silvestres y llegar a las casas atraídos por la luz. Tomando en conjunto los presentes hallazgos, se permite concluir que en la ciudad persiste el riesgo de micro-epidemias de Chagas agudo.

* Tesis de maestría.

** Facultad de salud. Escuela de medicina. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Directora de tesis.

TITLE: GENETIC CHARACTERIZATION OF *TRYPANOSOMA CRUZI* ISOLATES CIRCULATING IN THREE AREAS OF BUCARAMANGA*

AUTHORS: PINTO GOMEZ Jenny Alexandra; GONZÁLEZ RUGELES Clara Isabel **.

KEY WORDS: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Reservoirs, Triatomines, DTU.

ABSTRACT

Outbreaks of acute Chagas of probable oral transmission have occurred in Santander department from Colombia, including its capital Bucaramanga. In the present study a search was conducted in humans, reservoirs and vectors from three suburban areas of the city of Bucaramanga. These areas have similar ecotopes to the places where three outbreaks occurred. Serological, parasitological and molecular methods were used for the detection of *T. cruzi* in human samples and parasitological and molecular methods were used in reservoirs and vectors.

The study showed a 2.7% seroprevalence in humans however blood cultures and PCR assays were negative. *T. cruzi* infection was identified in 32% of peri-urban wild reservoirs, all *D. marsupialis*. The blood culture was positive in 6/25 samples, and PCR assays in 8/25. All isolates were DTU1, the genotyping was realized using SL-IR, 24S α and 18s rRNA gene amplification. The genotype determined through analysis of microsatellite motif SL-IR was G2 in five isolates and G11 in one. Captured vectors belong to the species *R. pallescens* and *P. geniculatus*. *T. cruzi* was detected by PCR in 5/8 samples, and isolates were obtained in 2/8 samples characterized as TCI and G2 genotype. All species were captured inside homes as intrusive species. The findings suggest the presence of reservoirs and infected vectors, being the main reservoir *D. marsupialis*; vectors could be living next to wild reservoirs and reach the houses attracted by light. Since many of the vectors are females with oviposition, this could mean that it is initiating a process of domiciliation in these areas. These findings could indicate that the risk of acute Chagas micro epidemics persists in the city of Bucaramanga.

* MSc. Thesis.

** Health Faculty. Medicine School. Biomedics Basic Sciences Master Program. Thesis director.

INTRODUCCIÓN

Según la OMS se estima que en Latinoamérica hay cerca de 7 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi* y más de 100 millones están en riesgo de adquirir la infección. Actualmente la enfermedad de Chagas presenta una incidencia anual de 28.000 casos en América y causa en promedio 12.000 muertes por año (WHO, 2015).

La prevalencia de tripanosomiasis en Colombia se ha estimado entre 700.000 y 1.200.000 infectados y 8.000.000 de individuos en riesgo de adquirir la infección (Ministerio de la protección Social, 2010). En Colombia, los departamentos que presentan una mayor endemia son: Casanare, Arauca, Santander, Boyacá, Norte de Santander y Cundinamarca (Ministerio de la protección Social, 2010). En el departamento de Santander en algunas localidades la seroprevalencia es superior al 40% (Corredor, 1993; Gutierrez *et al.*, 2004).

T. cruzi presenta gran variabilidad en términos de virulencia, infectividad, tropismo tisular y resistencia a drogas (Andrade *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 2014; Souto *et al.*, 1996). La enfermedad de Chagas presenta diferentes características en cuanto a severidad y formas clínicas, esto se atribuye a la respuesta inmune del hospedero y a la heterogeneidad genética del parásito (Revollo *et al.*, 1998). *T. cruzi* se encuentra dividido en 7 Unidades Discretas de Tipificación (denominadas DTU) correspondientes a TcI hasta TcVI, y una séptima referida como Tcbat, las cuales muestran una distribución variable, tanto a nivel geográfico, como de vectores y reservorios (Perez *et al.*, 2014). La diversidad de *T. cruzi* representa un factor de importancia epidemiológica, sin embargo es necesario llevar a cabo estudios a escala local para un mejor entendimiento de la diversidad genética y la dinámica de transmisión (Cardinal *et al.*, 2008).

Estudios previos en Colombia han demostrado la presencia de las 6 DTUs en el país (Guhl & Ramírez, 2013), de igual forma estudios en Santander llevados a

cabo en vectores y humanos mostraron la presencia de DTU TcI y TcII (González *et al.*, 2010; Guhl & Ramírez, 2013; Mantilla *et al.*, 2010; Zafra *et al.*, 2008). Sin embargo estos estudios involucran humanos reservorios y vectores que se encuentran en áreas geográficas diferentes, por lo tanto no se han establecido asociaciones reservorio-vector-humano en áreas particulares. Esta información podría ser fundamental para establecer medidas de control y prevención, y definir asociación de genotipos particulares con la circulación del parásito o con las diferentes formas clínicas, especialmente en la actualidad donde en Santander se han presentado el mayor número de brotes de Chagas agudo los cuales eran inusuales antes de 2008 (Soto *et al.*, 2014).

1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

1.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad de Chagas se encuentra principalmente en áreas endémicas de 21 países de Latinoamérica en los cuales su distribución ha sido descrita como variable y heterogénea involucrando diferentes nichos. Entre las enfermedades transmisibles, la enfermedad de Chagas es la cuarta causa de pérdida económica, con un costo estimado de 667.000 años de vida perdidos por discapacidad y presenta un impacto económico significativo, el costo global de esta enfermedad se ha estimado en 7.19 billones de dólares por año, cifra similar o incluso mayor que otras enfermedades importantes. El costo global se debe en gran parte a la pérdida de productividad fruto de la enfermedad cardiovascular que induce mortalidad temprana (Garcia *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013; Pinazo *et al.*, 2015; Kalil-Filho *et al.*, 2015).

Se ha estimado que en el continente americano cerca de dos millones de mujeres en edad fértil se encontrarían infectadas por *Trypanosoma cruzi*, de las cuales entre un 4 a un 8% transmitirían la enfermedad por vía transplacentaria (Vega *et al.*, 2015).

En Estados Unidos se estima que cerca de 300.000 personas se encuentran infectadas con *T. cruzi* y más de 100.000 en el continente europeo, principalmente España (Bem, 2009, Schmunis *et al.*, 2010).

En Colombia se estima que la prevalencia en donantes de sangre es del 2,1% con una cobertura de tamizaje cercana al 100% (Vega *et al.*, 2015). Un estudio nacional de prevalencia encontró una infección Chagásica de 35 por 1.000 niños menores de 15 años, principalmente en la región oriental del país. Esto indica que en esta región, cerca de 37.500 niños pueden estar afectados por la enfermedad (Vega *et al.*, 2015).

Según datos de la OMS en el 2010 en el país existían 131.388 casos de cardiopatía Chagásica (Vega *et al.*, 2015).

De acuerdo a los datos del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) durante el año 2014 fueron notificados 855 casos de enfermedad de Chagas de los cuales 619 fueron casos confirmados. Los municipios con mayor número de casos fueron Boyacá (27%), Casanare (24%) y Santander (11,5%) En Santander se presentaron el 10% de los casos crónicos y el 17% de los casos agudos reportados en el país (Vega *et al.*, 2015).

1.2. *TRYPANOSOMA CRUZI*

T. cruzi es un parásito protozoo, hemoflagelado, perteneciente al orden Kinetoplastida, familia Tripanosomatidae (Fig.1). Descrito por primera vez por Carlos Chagas en 1909, es el agente etiológico de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas (Miles, 1999). Se caracteriza por presentar un único flagelo y una sola mitocondria en la cual se sitúa el cinetoplasto, una organela especializada que contiene ADN (de Lana & Machado, 2010).

Este parásito presenta tres estadios según su morfología (Fig. 2) y posición del cinetoplasto en relación al núcleo: epimastigote, el cual presenta una forma alargada, cinetoplasto anterior al núcleo y flagelo; tripomastigote, de forma más alargada que el epimastigote, cinetoplasto posterior al núcleo y flagelo que se extiende por toda la célula y amastigote de forma ovalada, carece de flagelo libre y cinetoplasto anterior al núcleo (Brener, 1973).

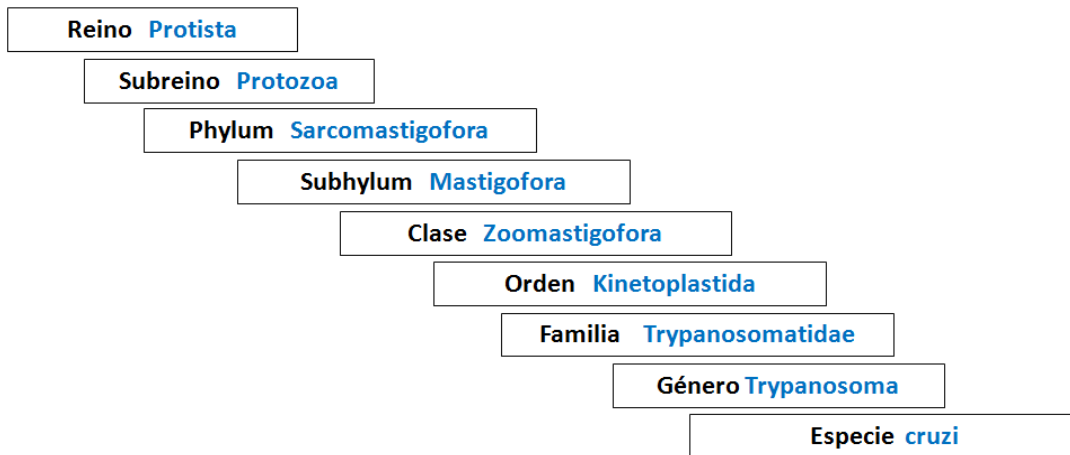


Figura 1. Taxonomía de *Trypanosoma cruzi*

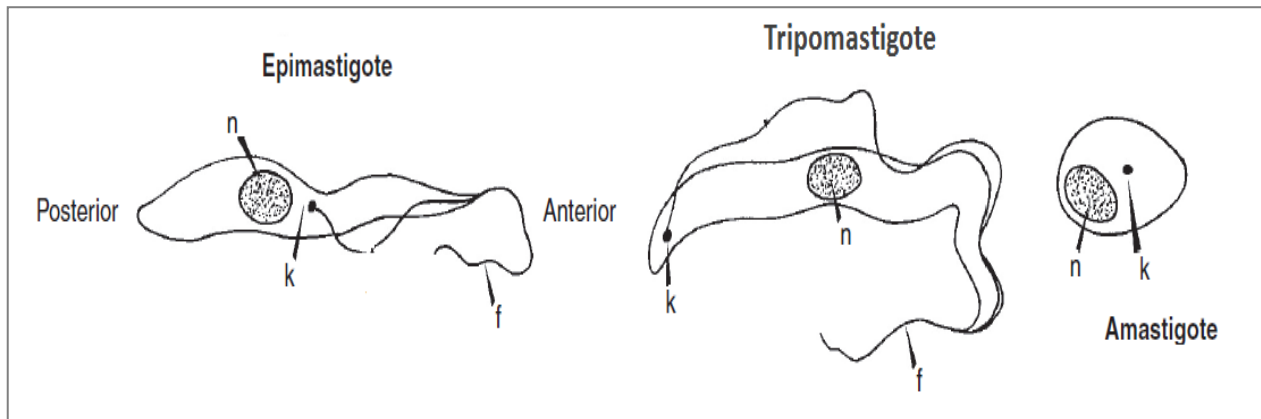


Figura 2. Estadios de *T. cruzi*. Los tripomastigotes miden de 15-20 μm , los epimastigotes 20 μm y los amastigotes de 4-5 μm .

Fuente: Kirchhoff y col 2014

1.2.1. Ciclo de vida

T. cruzi presenta un ciclo de vida diheteroxeno, entre un hospedero invertebrado y uno vertebrado. El hospedero invertebrado es un insecto hematófago de la subfamilia Triatominae. Este ingiere la forma tripomastigote presente en la sangre de los mamíferos infectados, estas formas sufren diferenciación transformándose en epimastigotes los cuales se multiplican por fisión binaria en el intestino medio

del vector y tras aproximadamente dos semanas se diferencian en el intestino posterior en tripomastigotes metacíclicos, desde donde luego son eliminados por el insecto en las heces. Estas formas entran al organismo del mamífero a través de lesiones o de las mucosas, transformándose en amastigotes en las células del hospedero. Allí se multiplican por fisión binaria, se diferencian a tripomastigotes, los cuales debido a su aumento en número darán lugar al estallido de la célula siendo liberados al torrente sanguíneo, invadiendo nuevas células o pudiendo ser ingeridos por el insecto vector (Fig. 3) (Brener, 1973; Tyler & Engman, 2001).

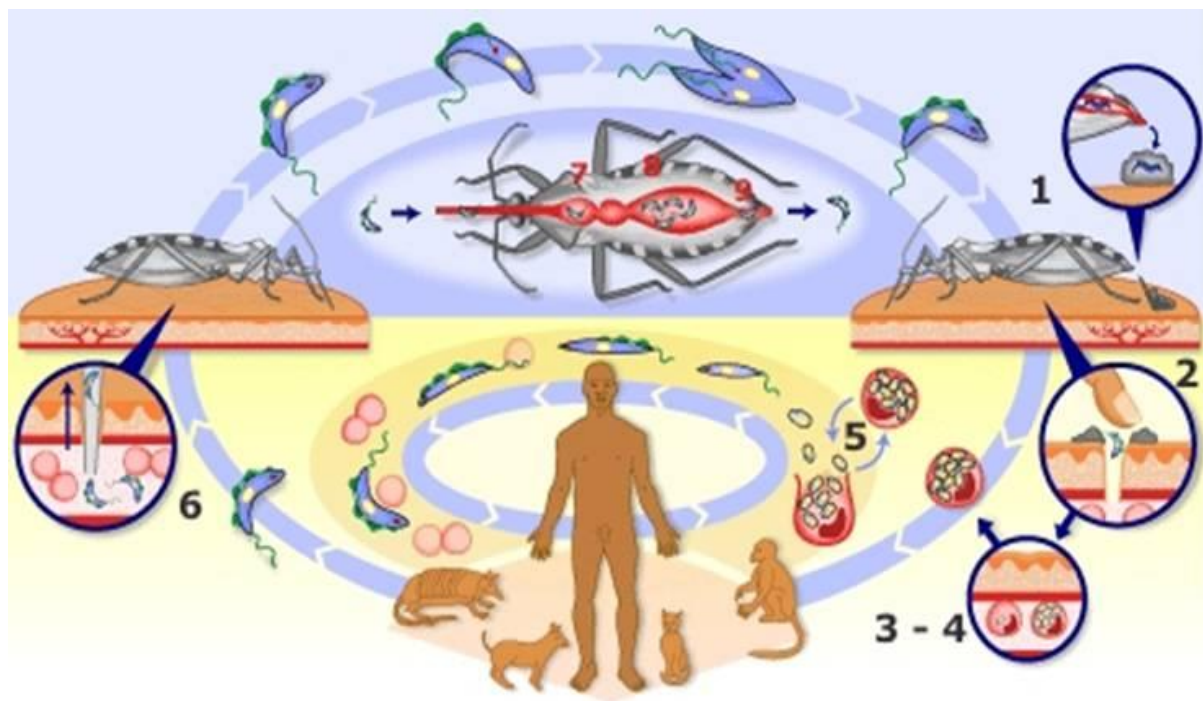


Figura 3. Ciclos de vida de *Trypanosoma cruzi*.

Fuente: <http://www.who.int/tdr/diseases/Chagas/lifecycle.htm>

1.2.2. Ciclos de transmisión

Originalmente la enfermedad de Chagas fue una zoonosis que involucró mamíferos y triatominos selváticos en focos naturales, en los cuales estaban ausentes los humanos y los animales domésticos. Como resultado del contacto

vector-humano en áreas rurales y los cambios sufridos en los biotopos naturales, la enfermedad se propagó hacia sitios domésticos y peridomésticos (WHO, 2002). La distribución geográfica de los triatominos y los vertebrados asociados a dichos vectores define los ciclos de transmisión (Fig. 4) (Macedo *et al.*, 2004).

1.2.2.1 Ciclo doméstico: la transmisión se presenta en lugares en los cuales los triatominos se adaptan a las viviendas humanas, principalmente en zonas rurales o zonas periurbanas, en viviendas de mala calidad, con paredes de bareque o adobe y techos de material vegetal. Los humanos junto con perros, gatos y animales peridomésticos cumplen un papel importante como fuente de alimento para los triatominos domiciliados, convirtiéndose en reservorios importantes de este ciclo (F. Díaz *et al.*, 2007; WHO, 2015).

1.2.2.2 Ciclo peridoméstico: en este intervienen mamíferos tales como roedores, marsupiales, perros y triatomas selváticos atraídos a las casas por la luz y el alimento. Este ciclo sirve de nexo entre el ciclo selvático y el doméstico (F. Díaz *et al.*, 2007).

1.2.2.3 Ciclo selvático: este involucra la interacción entre vectores silvestres y mamíferos selváticos incluyendo marsupiales, roedores, armadillos y otros animales (F. Díaz *et al.*, 2007).

Estos ciclos pueden solaparse mediante diferentes mecanismos como:

- Triatominos y mamíferos silvestres (principalmente marsupiales) son atraídos al peridomicilio en busca de alimento, ya sea sangre de animales peridomésticos en el caso de los triatominos y de los alimentos de animales como cerdos, vacas y gallinas en el caso de los mamíferos silvestres.
- Animales peridomésticos pueden visitar el ecotopo silvestre ya sea para pastar o para cazar infectándose a partir de animales y triatominos silvestres.

- Triatomos silvestres pueden gradualmente invadir las viviendas humanas y adaptarse al ciclo doméstico alimentándose de sangre humana.
- Triatomos silvestres bajo ciertas situaciones pueden ser atraídos por la luz hacia el domicilio y alimentarse de sangre humana si las fuentes de alimento silvestres son escasas.
- Marsupiales pueden invadir las viviendas de forma directa en busca de alimento.
- El hombre a través de acciones como deforestación, extracción de flora para alimento, construcción o industria invade los ecotopos silvestres donde se puede infectar con *T. cruzi* o transportar triatomos infectados hacia las viviendas junto con madera fibras y hojas de palma (Coura *et al.*, 2013).

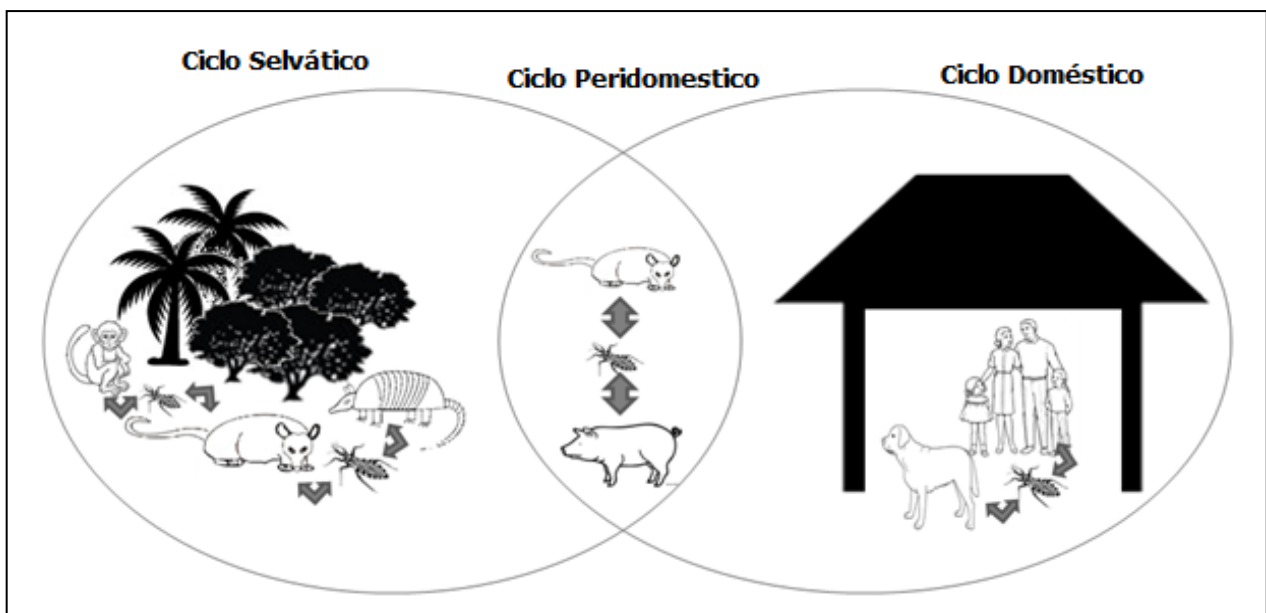


Figura 4. Ciclos de transmisión de *T. cruzi*

1.3. PRINCIPALES RESERVORIOS DE *T. CRUZI*

Actualmente *T. cruzi* circula en más de 150 especies de mamíferos de 24 familias pertenecientes a animales domésticos y silvestres (Miles *et al.*, 2003). Las especies mamíferas difieren en su importancia como fuente de infección para el insecto vector. De igual forma una misma especie mamífera puede jugar diferentes roles en el mantenimiento del parásito de acuerdo al tiempo y la región donde se encuentre (Jansen & Roque, 2010).

Noireau y colaboradores definen como reservorio a una especie o grupo de especies que son responsables del mantenimiento de un parásito dado, por un periodo de tiempo prolongado en un ambiente determinado (Noireau *et al.*, 2009). Se consideran reservorios de mantenimiento a aquellos capaces de estar infectados y retener la infección de un parásito dado y reservorio amplificador a aquellos que muestran una característica de infección que favorece la transmisión del parásito (Jansen & Roque, 2010).

Respecto a *T. cruzi* la transmisibilidad de una especie mamífera a un vector triatomino está garantizada si el hospedero presenta formas infectivas del parásito circulando en sangre. Contrario a esto, la transmisión entre mamíferos puede darse en ausencia de formas infectivas en sangre a través de la predación por medio de los amastigotes presentes en el tejido de la presa (Jansen & Roque, 2010).

1.3.1. *Didelphis sp*

El género *Didelphis* deriva su nombre como referencia al tracto reproductor de las hembras (di=dos; delphys=uterio) (Krause & Krause, 2006). La Zarigüeya, nombre común dado a los miembros de este género, pertenece a la clase *Mammalia*,

infraclase *Marsupialia*, orden *Didelphimorfia*, familia *Didelphidae*, subfamilia *Didelphinae*, género *Didelphis* (Gardner, 2005; Rueda *et al.*, 2013)). La familia *Didelphidae* posee nueve especies las cuales se distribuyen geográficamente desde el sur de Canadá hasta el centro de Argentina y se encuentran a alturas desde el nivel del mar hasta por encima de 3000 m y ocupan casi todo tipo de hábitats (Cuartas-Calle & Arango, 2003; Gardner, 2005; Rueda *et al.*, 2013).

El género *Didelphis* se compone de seis especies: *Didelphis virginiana* que se encuentra en Norte y Centroamérica, *Didelphis marsupialis* de Centro y Suramérica, *Didelphis albiventris* encontrada en las tierras altas al sur de Suramérica, *Didelphis pernigra* en las montañas andinas desde Bolivia a Venezuela, *Didelphis imperfecta* encontrada en Brasil, Venezuela y Guyana Francesa, y *Didelphis aurita* nativa del bosque atlántico de Brasil (Krause & Krause, 2006; Lemos & Cerqueira, 2002). Estas especies conocidas como zarigüeyas son de hábitos nocturnos, sin embargo pueden estar activos en el día en temporadas frías cuando es más difícil obtener alimentos (Krause & Krause, 2006). Las guaridas de las zarigüeyas son variadas según donde se encuentren, puede ser una madriguera abandonada, un túnel subterráneo, un árbol hueco, nidos abandonados, huecos entre las rocas, lugares oscuros en las viviendas. Ellas no cavan sus madrigueras, en lugar de ello ocupan madrigueras abandonadas de otros animales (Krause & Krause, 2006) . Su alimentación es omnívora, consumiendo plantas y animales. La dieta incluye gran variedad de insectos, lombrices, caracoles, serpientes, lagartos, ranas, pequeños roedores (principalmente ratones y ratas), conejos jóvenes, pequeños pájaros, huevos, hierbas, verduras, frutas, bayas, granos, basura humana y carroña. La zarigüeya es un alimentador oportunista y se come lo que está disponible en su entorno en un momento dado. Su sentido del olfato es importante para la localización de la comida o las presas. Si la comida disminuye en un área expandirá su territorio o se moverá a un área nueva. Se consideran generalmente nómadas, tímidos y solitarios, ocupan un territorio específico por un tiempo para después mudarse.

Presentan un comportamiento antisocial principalmente entre machos. Durante el periodo de apareamiento hay un comportamiento agresivo entre los sexos opuestos, sin embargo tras el cortejo pueden permanecer días juntos (Krause & Krause, 2006). Las zarigüeyas presentan una alta tasa de mortalidad durante su primer año de vida. Los individuos que viven su segundo año de vida muestran signos de edad avanzada como pérdida de peso, pérdida de la coordinación motora y formación de cataratas. Cuando se encuentran en cautiverio pueden vivir el doble de un animal silvestre (Krause & Krause, 2006).

El género *Didelphis* es reconocido como el reservorio más importante de *T. cruzi* ya que cursa con parasitemias altas y prolongadas. Además por su comportamiento sinantrópico es considerado un excelente reservorio en el ambiente doméstico, peridoméstico y hábitats alterados (Jansen & Roque, 2010; Noireau et al., 2009). Su importancia como reservorio varía en tiempo y espacio, se han observado tasas de infección entre 11 y 90%. Sus hábitos omnívoros favorecen la adquisición oral de la infección a través de la predación de triatomíneos o mamíferos pequeños que se encuentran infectados (Jansen & Roque, 2010).

Este género presenta un par de glándulas localizadas entre las paredes laterales del canal anal las cuales son a menudo referidas como glándulas para-cloacales, perianales u odoríferas; la liberación del material de la glándula parece ocurrir por control voluntario cuando las zarigüeyas son manipuladas. El rol como marca territorial es desconocido (Krause & Krause, 2006). En un *Didelphis* infectado los parásitos pueden alcanzar el lumen de la glándula paranal donde los tripomastigotes se diferencian en epimastigotes los cuales se multiplican por fisión binaria, después se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, forma infectiva del parásito liberados en las secreciones de esta glándula (Jansen & Roque, 2010). Los factores que definen la colonización de la glándula son desconocidos, sin embargo se cree que existe una correlación entre las altas parasitemias y su colonización (Jansen & Roque, 2010). Por lo anterior

Didelphis puede actuar como reservorio y vector de *T. cruzi* y sugiere un mecanismo de transmisión antiguo antes de la adquisición de hábitos hematófagos de los triatominos (Noireau et al., 2009). En muchas regiones del país las zarigüeyas son cazadas para su posterior consumo. Sin embargo las poblaciones de zarigüeyas cumplen un papel importante en el control de la población de roedores y artrópodos (Rueda et al., 2013).

1.3.2. Armadillos

Los armadillos pertenecen al orden *Xenarthra*, familia *Dasypodidae*, género *Dasypus*, se encuentran distribuidos geográficamente desde Norte hasta Suramérica (da Silveira Anacleto, 2007). Son considerados tras los marsupiales los reservorios más antiguos de *T. cruzi* (Jansen & Roque, 2010). Habitan diferentes tipos de bosques, áreas periurbanas y hábitats degradados (Abba & Superina, 2010). Presentan hábitos nocturnos o crepusculares y son generalmente solitarios. Se alimentan de insectos, ciempiés, lombrices y en menor medida pueden consumir huevos y frutos vegetales (Abba & Superina, 2010).

Su tasa de infección oscila entre el 4-50%, son animales que entran al peridomicilio en busca de huevos o pollos como fuente de alimentación y en sus madrigueras se han encontrado triatominos del género *Panstrongylus* (Jansen & Roque, 2010).

1.3.3. Roedores

Comparten micro-hábitat con *Triatoma* y *Panstrongylus*. Debido a su frecuencia en las viviendas humanas participan en el ciclo peridoméstico. Su tasa de infección puede llegar al 44% y cursan con parasitemias prolongadas (Jansen & Roque, 2010).

1.3.4. Importancia de las aves y otros vertebrados terrestres

Las aves, los reptiles y los anfibios son refractarios a la infección por *T. cruzi* debido a que presentan un efecto lítico en el parásito mediado por el complemento. Sin embargo juegan un importante rol como fuentes de alimento de los triatomíneos, especialmente las aves. En los lugares donde los triatomíneos se alimentan de pollos y cerdos, las tasas de infección por *T. cruzi* son una quinta parte de lo encontrado en insectos que se alimentan de humanos y animales domésticos. No está claro si la presencia de aves es benéfico debido a la reducción en la tasa global de infección por *T. cruzi* en los vectores ya que dichos insectos son consumidos por las aves, o por el contrario puede ser perjudicial debido a que una alta tasa de población de insectos es mantenida por una abundante fuente de alimento (WHO, 2002).

1.4. EL VECTOR

El insecto vector transmisor de *T. cruzi* pertenece al orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae* (triatomino) (Hanford & Zhan, 2011).

Los triatomíneos se encuentran subdivididos en cinco tribus: Triaomini con nueve géneros y 110 especies, Rhodiini con dos géneros y 20 especies; Alberproseniini un género dos especies, Bolboderini cuatro géneros con 14 especies y Carvernicolini con un género y dos especies (Stevens et al., 2011).

De acuerdo al grado de interacción con el humano los triatomíneos se pueden clasificar como vectores primarios, secundarios y candidatos. Las especies definidas como primarias colonizan permanentemente las viviendas, son claramente antropofílicas y presentan una tasa de infección por *T. cruzi* alta. Las

especies secundarias son especies propias de cada región las cuales invaden y colonizan las viviendas en ausencia de los vectores primarios y su habilidad de transmisión de *T. cruzi* al hombre ha sido probada. Los vectores candidatos son aquellos que invaden estructuras en el peridomicilio pero son incapaces de colonizar las viviendas, su capacidad de transmitir el parásito al hombre es cuestionable aún. Las tribus más importantes epidemiológicamente son las Rhodniini y Triatomini (Noireau *et al.*, 2005; Stevens *et al.*, 2011).

Los vectores domésticos más importantes en la región andina de Latinoamérica son *R. prolixus*, *T. dimidiata* y *T. infestans*, los vectores secundarios en esta región son *T. maculata*, *R. ecuadoriensis*, *R. pallescens*, *T. venosa*, *T. carrioni*, *P. herreri*, *P. chinai*, *P. geniculatus* y *P. rufotuberculatus* (Stevens *et al.*, 2011).

Gaunt y Miles plantean una asociación entre el hábitat y la especie en los tres triatominos más importantes, el género *Rhodnius* se encuentra asociado con palmas, el género *Pastrongylus* se encuentra en madrigueras y agujeros de árboles y el género *Triatoma* está asociado con hábitats rocosos y madrigueras de roedores (Noireau *et al.*, 2005). Sin embargo algunas especies exhiben un gran rango de ecotopos terrestres y arbóreos como son *P. megistus*, y *T. dimidiata* (Noireau *et al.*, 2009).

1.4.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida del vector inicia con un huevo el cual pasa a adulto a través de cinco estadios ninfales, sin estado de pupa. Una sola hembra puede poner 1000 huevos en su vida, siendo 500 lo más usual (Lent & Wygodzinsky, 1979). La eclosión se da 10 a 30 días después de la ovoposición. El primer estadio ninfal está listo para alimentarse 48 a 72 horas después de eclosionar y para realizar la muda cada estadio requiere al menos una alimentación completa (Lent & Wygodzinsky, 1979). Todos los estadios de los triatominos son hematófagos y tienen la capacidad de transmitir *T. cruzi*, sin embargo es poco probable en el primer estadio ya que debe adquirir el parásito de una alimentación

inicial y a menudo muda al segundo estadio antes de alimentarse de nuevo (Lent & Wygodzinsky, 1979; Stevens et al., 2011).

1.4.2. Comportamiento biológico

Los triatominos poseen diversas modalidades sensoriales para localizar los hospederos. Estos incluyen gradientes de dióxido de carbono, olores, humedad, calor y flujo de aire (Stevens et al., 2011). En las habitaciones humanas los triatominos prefieren la oscuridad y lugares protegidos como grietas en las paredes, muebles, cajas con papeles o ropa (Lent & Wygodzinsky, 1979). Los triatominos permanecen inmóviles durante el día y emergen en la noche buscando porciones descubiertas de personas durmiendo o animales domésticos. Los insectos domésticos pueden alimentarse durante el día si la oportunidad se presenta (Lent & Wygodzinsky, 1979). La alimentación de los triatominos toma en promedio de 20 a 30 minutos, en el caso de *T. infestans* y *T. dimidiata* y en *R. prolixus* el tiempo de alimentación es entre 11 y 28 minutos. La picadura no produce dolor debido a la acción anestésica de la saliva. Los triatominos pueden permanecer sin alimentarse por meses reduciendo sus actividades durante las temporadas frías (Lent & Wygodzinsky, 1979; Stevens et al., 2011). Los vectores se alimentan a menudo con un volumen de sangre superior a su propio peso, para liberar el exceso de fluidos los insectos pueden defecar durante la alimentación, al finalizar o después de dejar el sitio de alimentación (Stevens et al., 2011). El tiempo entre la alimentación y la subsecuente defecación varía entre especies (Lent & Wygodzinsky, 1979). Muchas especies, especialmente las domésticas defecan rápidamente cerca o sobre el hospedero (Stevens et al., 2011). Experimentalmente se encontró que el rango de parásitos por defecación es de 51 a 276, aunque puede encontrarse 1500 parásitos por defecación (Coura, 2007). Estudios han mostrado que los triatominos infectados con *T. cruzi* no se muestran afectados en cuanto a su desarrollo y tasa de mortalidad respecto a triatominos no infectados (Schaub, 2009).

1.4.3. Vectores de importancia en Colombia

En Colombia los principales vectores adaptados a hábitats humanos en orden de importancia son *R. prolixus*, *T. dimidiata*, *T. venosa*, también se encuentran vectores con capacidad vectorial limitada como son *T. maculata* y *R. pallescens* así como vectores vinculados a brotes accidentales de transmisión oral como *R. pallescens* y *P. geniculatus* los cuales son especies silvestres (Ministerios De La Protección Social, 2010).

Rhodnius prolixus: es el vector doméstico principal de la enfermedad de Chagas en Colombia. Se encuentra en hábitats selváticos, tales como las cimbras de las palmeras, además de las casas. Puede realizar su desarrollo desde huevo hasta adulto en 3-4 meses y puede alcanzar altas densidades al interior de las viviendas.

Triatoma dimidiata: encontrado en variedad de ecotopos selváticos sobre todo en montones de rocas y cuevas ocupadas por murciélagos. También se encuentra en árboles huecos y se cree que la recogida de leña representa uno de los métodos por los cuales los triatomíneos pueden introducirse en las casas. Las ninfas tienen hábitos crípticos, a menudo camuflándose con polvo que les cubre la superficie dorsal y en las casas prefieren las grietas a nivel del suelo y espacios bajos. Las colonias domésticas tienden a ser pequeñas. Tiene un intervalo entre las generaciones prolongado, tardando a menudo un año en completar su desarrollo desde huevo hasta adulto (Ministerios De La Protección Social, 2010)).

Rhodnius pallescens: es considerado un vector secundario, puede invadir el domicilio, pero en general la densidad poblacional es baja. Se asocia con ecotopos silvestres y peridomésticos. En áreas en donde vectores primarios

como *R. prolixus* han sido controlados las viviendas estarían en riesgo de ser re-invasadas por esta especie. Completa su ciclo de vida en un periodo de 4 meses o más según la fuente de alimento. Estudios en laboratorio han mostrado que *R. pallescens* presenta una capacidad igual o superior de transmitir *T. cruzi* en comparación con *R. prolixus* (Jaramillo et al., 2000).

Panstrongylus geniculatus: es la especie de mayor distribución entre el género *Panstrongylus*, desde México a Argentina. Se encuentra en gran variedad de hábitats incluyendo madrigueras de armadillos, zarigüeyas, roedores y aves así como en árboles y varias especies de palmas; completa su ciclo de vida en aproximadamente 8 meses en condiciones de laboratorio. Se encuentra frecuentemente en ambientes peridomésticos y su presencia al interior viviendas ha sido reportada (Patterson et al., 2009)

1.5. FASES CLINICAS

La enfermedad de Chagas presenta tres fases clínicas: la **fase aguda** puede ser asintomática o presentar síntomas tras 1 a 2 semanas de infección, tales como fiebre prolongada, malestar, adenopatía generalizada, edema, signo de Romaña, hepato-esplenomegalia que puede ser seguida de vómito, diarrea y anorexia, chagoma en la transmisión vectorial y anormalidades en el ECG. Las manifestaciones se resuelven de forma espontánea en el 90% de los infectados no tratados con fármacos tripanocidas (Coura, 2007; Rassi Jr et al., 2010). La muerte ocurre en 5-10% de los casos sintomáticos como resultado de una miocarditis, meningoencefalitis o ambos. Cerca del 60-70% de los pacientes presentan la **fase indeterminada** en la cual no hay enfermedad clínica aparente, los individuos presentan seropositividad para anticuerpos anti-*T. cruzi* y electrocardiograma, radiología de tórax, colon y esófago normales. Entre un 30-40% de los individuos tras 10-30 años post-infección desarrollan la **fase crónica** de la enfermedad, ya sea la forma cardíaca, digestiva o cardio-digestiva. La muerte súbita es la principal causa de muerte en pacientes con cardiopatía chagásica seguido de

insuficiencia cardíaca y tromboembolismo. La muerte súbita puede ocurrir en pacientes quienes fueron previamente asintomáticos (Coura, 2007; Rassi Jr et al., 2010).

1.6. VÍAS DE TRANSMISIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

1.6.1 Vectorial: a este mecanismo se le atribuye el 80% de los casos en áreas endémicas y se produce a través del contacto de las heces infectadas con mucosas o lesiones (Schofield & Dujardin, 1997).

1.6.2 Transfusional: es el segundo mecanismo en importancia de transmisión. La infección transfusional se ha convertido en un serio problema en países no endémicos debido a la migración de pobladores infectados provenientes de regiones endémicas (WHO, 2015).

1.6.3 Transplacentaria: *T. cruzi* puede ser transmitido de la madre infectada al feto in útero a través de la placenta, la infección chagásica se produce en cualquier fase de la infección materna y el riesgo de transmisión es mayor en la fase aguda de la enfermedad (Bittencourt *et al.*, 2000).

1.6.4 Transmisión oral: se ha documentado la transmisión de la enfermedad de Chagas tras la ingestión de alimentos contaminados con triatominos o sus heces. En Colombia se informaron brotes de la enfermedad de Chagas con la presencia de miocarditis chagásica aguda y elevada tasa de letalidad. De acuerdo a los hallazgos clínicos, epidemiológicos y entomológicos el mecanismo posible de transmisión en dichos brotes fue la vía oral (Hernández *et al.*, 2009).

1.6.5 Trasplante de órganos: los individuos trasplantados con órganos de donadores con la enfermedad crónica desarrollarán episodios agudos de la enfermedad debido a su estado de inmunosupresión haciendo posible el aislamiento del parásito a partir de sangre periférica (Wendel, 1998). De igual

forma, la realización de trasplantes en personas infectadas por *T. cruzi*, puede dar lugar a reactivaciones de la infección, por lo cual estos individuos deben ser monitoreados (Bacal et al., 2010).

1.6.6. Accidental: se presenta en laboratorios y hospitales, la infección ocurre durante la manipulación de diferentes tipos de materiales contaminados, como excretas de triatominos, cultivos de parásitos y sangre infectada (F. Díaz et al., 2007).

1.7. PATOGENIA

El daño tisular durante la fase aguda es causado por el parásito y la respuesta inmune del hospedero la cual es desencadenada por la presencia de *T. cruzi*. Durante la fase crónica el balance entre la respuesta inmune para controlar el parásito y la inflamación causante de daño en el tejido del hospedero determina el curso de la enfermedad. Si la respuesta inmune es ineficiente o permite el daño tisular, tanto la carga parasitaria como la inflamación aumentarán. En contraste una respuesta inmune eficiente en la cual se reduce la carga parasitaria y las consecuencias inflamatorias son mínimas, resulta en un daño tisular reducido (Rassi Jr et al., 2010).

1.8. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

1.8.1 Métodos directos

Buscan detectar la presencia del parásito mediante observación directa de tripomastigotes y están indicados en la fase aguda de la enfermedad cuando se presenta parasitemia elevada. Dentro de los métodos directos se encuentran:

1.8.1.2 Exámen directo en sangre fresca: a partir de una gota de sangre la cual puede ser obtenida por punción digital, se observa entre lámina y laminilla con el objetivo de 10x y 40 x en busca de tripomastigotes.

1.8.1.3 Extendido de sangre periférica: se extiende una gota de sangre y se colorea con Romanowski modificado, Giemsa o Wright y se realiza la búsqueda de tripomastigotes sanguíneos. Esta prueba presenta baja sensibilidad.

1.8.1.4 Gota gruesa: permite visualizar el parásito concentrándolo en varias capas de sangre 20 a 30 veces en relación con el extendido de sangre.

1.8.1.5 Microhematocrito: la muestra de sangre es obtenida en un microhematocrito heparinizado el cual se centrifuga a 12000 rpm y se procede a observar en el microscopio en la interfase entre el plasma y los glóbulos rojos.

1.8.1.6 Técnica de concentración de strout: a partir de una muestra de sangre sin anticoagulante y una vez retraído el coágulo se toma el suero y se centrifuga a 1500 rpm para eliminar los glóbulos rojos y posteriormente se centrifuga a 3500 rpm para concentrar los parásitos en el sedimento el cual es observado entre lamina y laminilla o mediante coloración.

1.8.2 Métodos parasitológicos indirectos

El propósito de estos métodos es aumentar la sensibilidad diagnóstica por medio de la multiplicación del parásito.

1.8.2.1 Xenodiagnóstico: vectores libres de infección de 3 o 5 estadio son alimentados con sangre de los pacientes y tras 30 y 60 días se examinan las heces e intestino al microscopio para detectar tripomastigotes o epimastigotes de *T. cruzi*. Su realización sólo es posible en algunos centros de investigación.

1.8.2.2 Hemocultivo: para el hemocultivo son empleados medios como el triptosa de infusión de hígado (LIT) o infusión cerebro-corazón (BHI). Presenta una sensibilidad superior al xenodiagnóstico sin embargo en individuos en fase crónica se considera que no es superior al 40%. El tiempo para que un hemocultivo se torne positivo es de 30 a 60 días.

1.8.3. Métodos moleculares

Se basan en la amplificación de fragmentos del ADN los cuales son abundantes y específicos para el parásito. Para *T. cruzi* dos secuencias blanco han probado ser útiles para su diagnóstico, la región variable de los minicírculos del kADN y el ADN repetitivo nuclear de 195 pb. Esta metodología puede ser aplicada para detectar *T. cruzi* en muestras de sangre, heces de triatomíneos o de otros materiales biológicos y permite obtener una sensibilidad bastante alta. Otra importante aplicación de la PCR es en la detección de parásitos de individuos infectados crónicamente, así como en el diagnóstico de transmisión congénita. Debido a su complejidad solo puede ser realizada en laboratorios especializados (Corredor *et al.*, 1993; Ministerio De La Protección Social, 2010).

1.8.4. Métodos serológicos

Permiten la detección de anticuerpos (clase IgM e IgG) en el suero de los individuos infectados con *T. cruzi*. Tres métodos son ampliamente usados de forma convencional:

1.8.4.1. Ensayo Inmunoenzimático (ELISA): detecta anticuerpos por medio de anti-inmunoglobulinas ligadas a una enzima que en presencia de un sustrato forman un producto coloreado cuyo resultado es definido por la lectura de la absorbancia. Cada fabricante define el punto de corte por encima o por debajo del cual las muestras son consideradas como negativas o positivas.

1.8.4.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI): los anticuerpos del individuo infectado son detectados colocando el suero en contacto con una lámina

recubierta con epimastigotes como antígeno, por medio de anticuerpos anti-inmunoglobulina marcada con fluoresceína se revela la interacción antígeno-anticuerpo al observar en un microscopio de fluorescencia.

1.8.4.3 Hemoaglutinación indirecta (HAI): anticuerpos presentes en el suero del paciente reaccionan con hematíes sensibilizados con antígeno de *T. cruzi* provocando la aglutinación de los eritrocitos. El punto de corte depende del fabricante (Ministerio De La Protección Social, 2010).

1.9. TRATAMIENTO

El objetivo del tratamiento es erradicar el parásito y controlar los signos y síntomas de la enfermedad. En la actualidad solo dos fármacos han probado ser efectivos, Benznidazol y Nifurtimox, siendo Benznidazol más seguro y eficaz. El tratamiento es recomendado en todos los casos agudos, congénitos, casos de reactivación y pacientes menores de edad con enfermedad crónica. En adultos infectados, especialmente asintomáticos, el tratamiento es brindado con el objetivo de prevenir la progresión de la enfermedad. En los individuos con daño cardiaco avanzado el tratamiento está contraindicado (Rassi Jr et al., 2010).

1.10. GENOMA

Trypanosoma cruzi posee una población heterogénea compuesta de un conjunto de cepas que circulan en el ciclo doméstico y silvestre. La secuenciación del genoma del clon CL Brener reveló un genoma con un tamaño de alrededor de 110 Mb, altamente repetitivo (cerca al 50%) conteniendo un estimado de 22.570 genes en 41 pares de cromosomas (Martínez *et al.*, 2010).

Al igual que en otros tripanosomátidos la organización de los cromosomas de *T. cruzi* es peculiar, con genes codificantes de proteínas organizados en grandes unidades de transcripción policistrónica codificando 20 o más proteínas en una

hebra, los genes se encuentran separados por una región *switch* o de cambio de hebra (Teixeira *et al.*, 2011). Durante la transcripción del ADN se genera un pre-RNAm policistrónico el cual madura a través de un proceso denominado *trans-splicing* en el cual se cortan y añade en su extremo 5' un RNA pequeño denominado SL (spliced lider) obteniendo ARNm monocistrónico (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

En los tripanosomátidos el genoma mitocondrial es ADN concatenado de distintas masas conocido como ADN del cinetoplasto (kADN). Presenta una localización adyacente al cuerpo basal del flagelo en el interior de una única mitocondria. El kADN de *Trypanosoma* corresponde aproximadamente al 20-25% del total del ADN celular y consiste en una red de discos compuesta de cientos de minicírculos concatenados de 0.5-10 kb y docenas de maxicírculos concatenados de 20-40 kb. Mientras que las secuencias de los Minicírculos están presentes exclusivamente en los Kinetoplastida, los maxicírculos son homólogos a las moléculas de ADN mitocondrial encontradas en otros eucariotas (Teixeira *et al.*, 2011). Para la expresión génica, los transcritos mitocondriales sufren un proceso de maduración que consiste en la adición y delección de ribonucleótidos, especialmente uridinas, dicho proceso se denomina *editing* y es conducido por ARNs pequeños llamados ARN guías los cuales no son codificantes y se encuentran en los minicírculos (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

1.11. DIVERSIDAD GENÉTICA DE *T. CRUZI* Y CLASIFICACIÓN

T. cruzi presenta una estructura poblacional multiclonal en donde cada aislado podría estar conformado por un número finito de clones los cuales sufren selección de acuerdo con el hospedero mamífero y el vector en que se encuentre. Por otra parte también se presentan eventos de intercambio genético entre los aislados de *T. cruzi* y clones, constituyendo así una población heterogénea del parásito (Tibayrenc *et al.*, 1986).

El primer método que demostró la diversidad genética de *T. cruzi* fue el análisis de las variantes electroforéticas de las enzimas celulares (Isoenzimas). Miles y colaboradores propusieron tres grupos isoenzimáticos (zimodemos, Z1, Z2 y Z3) de acuerdo a las variantes. Estudios epidemiológicos demostraron que Z1 y Z3 estaban asociados con el ciclo selvático y Z2 con el ciclo doméstico (Macedo et al., 2004).

Morel y colaboradores publicaron los primeros estudios de polimorfismos de ADN en *T. cruzi*, reportando polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción tipificando el kADN de los minicírculos. El análisis del kADN mediante RFLP reveló una cantidad inesperada de diversidad genética en *T. cruzi* y demostró por primera vez que una sola cepa de *T. cruzi* podía contener dos o más clones distintos (Macedo et al., 2004). Souto y colaboradores en 1996 analizando diferentes aislados por medio de amplificaciones por PCR del dominio divergente del gen de 24S α rRNA, la secuencia del gen del mini exón y análisis de amplificación aleatoria de ADN polimórfico demostraron la división de *T. cruzi* en dos linajes con alta diversidad genética (Souto et al., 1996). Estudios posteriores de Brisse y colaboradores caracterizando muestras geográfica y ecológicamente diversas empleando la electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) y la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), soportaron la existencia de dos linajes mayores y subdividieron el segundo linaje en cinco grupos filogenéticos (Ila-Ile), concluyendo que *T. cruzi* parece estar dividido en 6 unidades discretas de tipificación (Brisse et al., 2000). En 2001 Brisse y colaboradores combinando los datos de los productos amplificados de la región intergénica del gen del mini exón, el gen de la subunidad 18S y la región divergente del 24S α ADN reforzaron la hipótesis de una subdivisión de *T. cruzi* en 6 linajes (I, Ila, I Ib, I Ic, I Id, I Ie) (Brisse et al., 2001).

La reunión de expertos realizada en Buzios en 2009 recomendó la subdivisión en seis DTUs, denominadas, desde TcI a TcVI (Zingales et al., 2009). DTUs es un

término que describe un conjunto de cepas que se encuentran genéticamente más relacionadas entre sí, que con cualquier otra cepa y pueden ser identificadas por medio de marcadores moleculares o inmunológicos comunes (Tibayrenc, 1998). Esta unificación en la nomenclatura de las cepas de *T. cruzi* permite una fácil comunicación entre investigadores y mejora la comprensión de las características biológicas, eco-epidemiológicas y de patogenicidad del parásito (Zingales et al., 2009). TcI y TcII han sido propuestos como los genotipos parentales y los DTUs III y IV se originarían por un primer evento de hibridación, mientras que TcV y VI serían generados en un segundo evento de hibridación (Westenberger et al., 2005).

Cada DTU presenta características particulares:

- *T. cruzi* I: es la más abundante y de mayor distribución de todas las DTUs de *T. cruzi* de igual forma es la más heterogénea, asociada tanto a ciclos domésticos como silvestres. Es el DTU predominante en la Amazonia brasileña, Venezuela, Colombia, Centroamérica y Norteamérica, donde es la mayor causa de enfermedad de Chagas aguda y crónica. Se ha reportado que 52 géneros de mamíferos se encuentran naturalmente infectados con esta DTU así como la mayoría de los géneros de triatominos (Zingales et al., 2012).
- *T. cruzi* II: subpoblación de parásitos predominante en el cono sur y regiones centrales de Suramérica. Se presenta frecuentemente en el ciclo doméstico, aun cuando hay registros de su presencia en reservas de primates poco intervenidas. Se encuentra asociado como agente causal en pacientes con cardiomiopatía y megavísceras en Brasil y los países del cono sur (Guhl & Ramírez, 2013; Zingales et al., 2012). De igual forma en Colombia ha sido encontrado en pacientes con cardiomiopatía chagásica (González et al., 2010; Mantilla et al., 2010; Zafra et al., 2008).
- *T. cruzi* III: subpoblación asociada tradicionalmente a la transmisión enzoótica, es considerado el tercer clado ancestral. Se ha encontrado en mamíferos terrestres y cavadores, aun cuando algunos casos humanos han sido atribuidos a este genotipo. A pesar de que su origen en la separación de subpoblaciones no está

del todo dilucidado, se le ha atribuído su aparición a eventos de hibridización. Su principal reservorio es *Dasybus novencintus*. Ha sido aislado desde el norte de América hasta el sur de Argentina.

- *T. cruzi* IV: subpoblación también asociada al ciclo silvestre, con registros en cánidos silvestres y ocasionalmente en casos humanos sin embargo es la segunda causa de enfermedad de Chagas en Venezuela. Su origen se le ha atribuído a eventos de hibridización. Es endémico en Norteamérica y se encuentra presente en el Amazonas.

- *T. cruzi* V: subpoblación asociada a ciclos de transmisión domésticos con un origen quizás en la hibridización de subpoblaciones domésticas y silvestres. Presente en casos humanos y en los triatomos de mayor abundancia del Cono Sur. Es el principal agente de la enfermedad de Chagas en la zona del gran Chaco.

- *T. cruzi* VI: subpoblaciones asociadas a casos humanos y al igual que TcV, frecuentemente asociada a triatomos domiciliados del cono sur. Se ha visto asociado a infección en perros y gatos. Su origen se atribuye al menos a dos procesos de hibridización (Herrera *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2012).

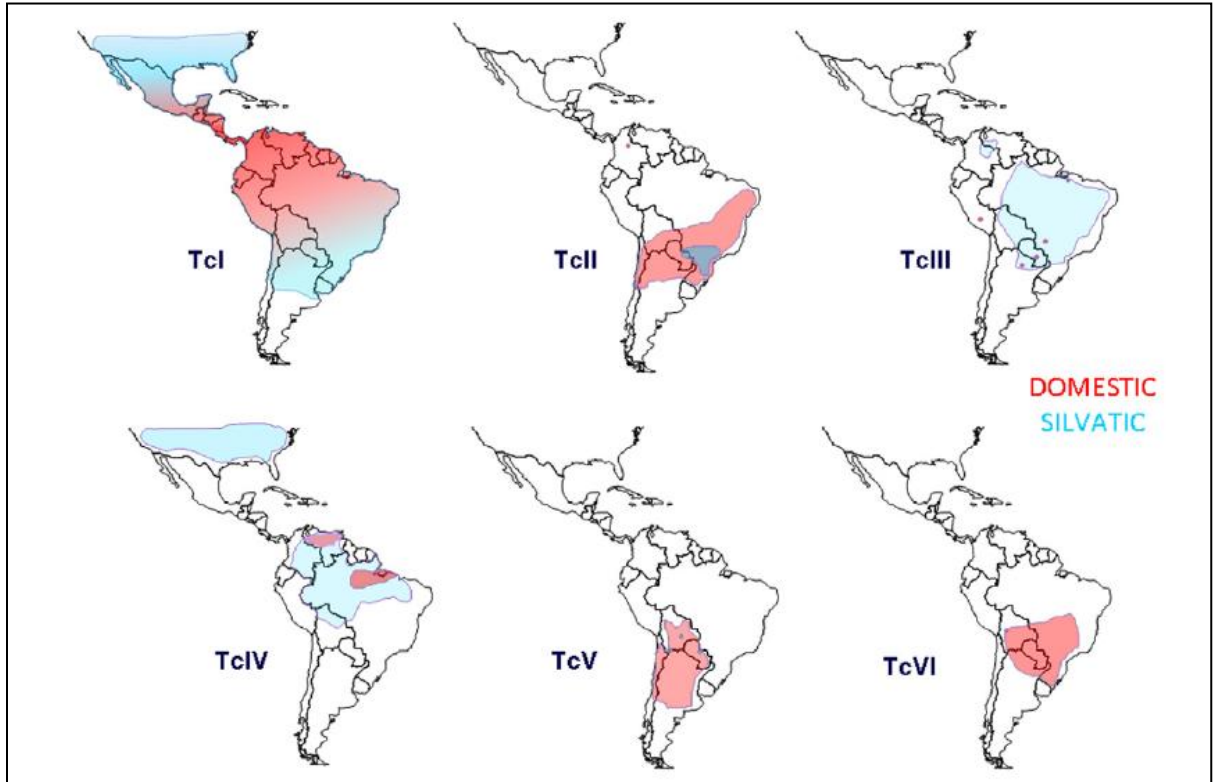


Figura 5. Distribución geográfica aproximada de las DTU de *T. cruzi* a nivel selvático y domestico

Fuente: Zingales y colaboradores 2012

1.11.1. Clasificación intra-DTU

Los genes del mini exón se encuentran dispuestos en tándem entre 1 a 200 copias por genoma. Dichos genes están separados por una compleja región intergénica variable. La región intergénica está compuesta por un intrón moderadamente conservado seguido por una zona de poli-T y una zona más variable no transcrita. La variabilidad de esta región fue probada como un marcador útil para la tipificación de *T. cruzi* permitiendo discriminar las DTUs. Sin embargo estas regiones son tan diferentes entre DTUs que tiene poca significancia en los estudios de filogenia dentro del taxón de *T. cruzi*, no obstante su estudio en un solo DTU puede ser relevante, como es el caso de TcI (Cura *et al.*, 2010; Falla *et*

al., 2009; Herrera *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2013). En dicha DTU el análisis de una región de 350 pb de un espaciador de mini exón (posterior a la región de poli-T) reveló un motivo de microsatélite al inicio de esta región, permitiendo la identificación de cuatro haplotipos entre cepas TcI colombianas (Ia-Ic) (Falla *et al.*, 2009; Herrera *et al.*, 2007). Análisis similares con cepas de América confirmaron la subdivisión dentro de TcI e identificaron un nuevo subgrupo (Ie) (Cura *et al.*, 2010). Sin embargo, esta clasificación fue reanalizada por Herrera en 2013 estableciendo un nuevo patrón del motivo de microsatélite (GT)_n (ATGT)_n (AT)_n (GT)_n, describiendo 26 genotipos que permitieron agrupar 242 de las 244 secuencias analizadas (Fig. 6)(Herrera *et al.*, 2013).

Tabla 1. Listado de los genotipos identificados por Herrera de acuerdo al motivo (GT)_n (ATGT)_n (AT)_n (GT)_n.

Genotipo Región Microsatélite	Motivo de nucleótidos y repeticiones
G1	(GT)9 (ATGT) 0 (AT)0 (GT)0
G2	(GT)8 (ATGT) 2 (AT)1 (GT)0
G3	(GT)7 (ATGT) 2 (AT)0 (GT)3
G4	(GT)7 (ATGT) 1 (AT)0 (GT)0
G5	(GT)7 (ATGT) 0 (AT)3 (GT)0
G6	(GT)6 (ATGT) 3 (AT)1 (GT)0
G7	(GT)6 (ATGT) 2 (AT)0 (GT)3
G8	(GT)6 (ATGT) 2 (AT)0 (GT)2
G9	(GT)6 (ATGT) 2 (AT)0 (GT)0
G10	(GT)6 (ATGT) 1* (AT)1 (GT)4
G11	(GT)6 (ATGT) 1 (AT)1 (GT)0
G12	(GT)6 (ATGT) 1 (AT)0 (GT)1
G13	(GT)6 (ATGT) 0 (AT)2 (GT)1
G14	(GT)6 (ATGT) 0 (AT)2* (GT)1
G15	(GT)6 (ATGT) 0 (AT)1 (GT)2
G16	(GT)5 (ATGT) 3 (AT)1 (GT)0
G17	(GT)5 (ATGT) 3 (AT)0 (GT)0
G18	(GT)5 (ATGT) 2 (AT)1 (GT)1
G19	(GT)5 (ATGT) 2 (AT)0 (GT)3
G20	(GT)5 (ATGT) 1 (AT)2 (GT)0
G21	(GT)4 (ATGT) 3 (AT)0 (GT)3
G22	(GT)4 (ATGT) 3 (AT)0 (GT)0
G23	(GT)4 (ATGT) 2 (AT)2 (GT)0
G24	(GT)4 (ATGT) 2 (AT)2 (GT)1
G25	(GT)4 (ATGT) 2 (AT)1 (GT)4
G26	(GT)4 (ATGT) 2 (AT)1 (GT)1

Distribución Genotipos en Colombia

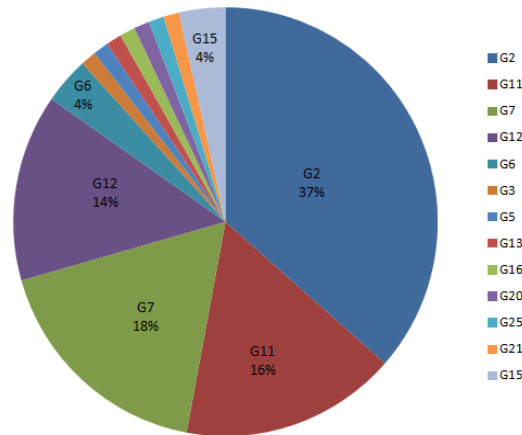


Figura 6. Distribución de los genotipos estudiados por Herrera en Colombia

1.12.1 Detección molecular de *T. cruzi*

1.12.1.1 ADN repetitivo de 195 pb

Constituye aproximadamente el 9% del ADN nuclear de *T. cruzi* y fue la primera secuencia nuclear repetida descrita en *T. cruzi* siendo obtenido tras someter el ADN total del parásito a la acción de la enzima *Bsp* I y ser separado en un gradiente de sacarosa. Estos ADN repetitivos presentan cierta analogía estructural y funcional con los ADNs satélite de eucariotas superiores como son, la extensa repetición en tándem, micro-heterogeneidad de secuencia y la aparente inactividad transcripcional. Sin embargo este ADN repetitivo de *T. cruzi* contiene marcos abiertos de lectura (Gonzalez *et al.*, 1984).

Por medio de los cebadores TCZ1 and TCZ2 se amplifica un producto de 188 bp en la secuencia de ADN repetitivo de 195 pb el cual no amplifica en otros *Trypanosomas* o *Leishmania* (Moser *et al.*, 1989; Virreira *et al.*, 2003). La abundancia y especificidad de los elementos repetitivos hacen de estos un blanco ideal para la detección de *T. cruzi*. Siendo la amplificación por PCR altamente

sensible detectando un número pequeño de parásitos como son 8 parásitos en 100 µl de sangre (Moser et al., 1989).

1.12.2. Marcadores asignación DTU

Un sistema basado en la amplificación por PCR de regiones particulares de la región intergénica del gen del mini exón, el rADN 24Sα y rADN 18s fue propuesto en el cual el polimorfismo en el tamaño de los productos de amplificación permite la asignación dentro de los seis DTUs (Tabla 2) (Zingales et al., 2012).

1.12.2.1 Polimorfismo del mini exón

El mRNA de los tripanosomas es el único en el que la mayoría, si no todos, llevan hacia 5' una secuencia de 35-pb conocida como spliced leader (SL) o mini-exón. Este SL es codificado en bloques de unidades repetidas en tándem que constituyen los genes del mini exón (ME). Alineamientos comparativos del ME de diferentes cepas de *T. cruzi* mostraron la presencia de regiones altamente conservadas de 39 pb (exones), regiones similares de 73 pb con más del 98% de identidad (intrones) y una región intergénica divergente (menos del 59% de similitud). Usando PCR es posible agrupar a *T. cruzi* en dos grupos de acuerdo a sus productos de amplificación. Cepas con un producto de amplificación de 300 pb y cepas con un producto de amplificación de 350 pb. (Macedo et al., 2004).

1.12.2.2 Polimorfismos del rADN

En tripanosomátidos el cistrón ribosomal exhibe una organización singular. Tanto la subunidad pequeña (SSU) como la subunidad grande (LSU) son

considerablemente más grandes que el rRNA típico de especies eucariotas. Particularmente interesante es la subunidad grande que contiene dos RNAs de alto peso molecular (24S α /24S β) y seis RNA de bajo peso molecular (S1-S6). El cistrón de rADN está formado por secuencias repetidas en las cuales las regiones codificantes de las subunidades están separadas por dos espaciadores transcritos internos. El ITS1 separa la región codificante de la subunidad 18S y la 5.8S y el ITS2 separa la secuencia de 5.8S rADN de la 24S rADN. La comparación entre el gen de 24S α rRNA de *T. cruzi* y los otros tripanosomátidos mostró alta homología, excepto en regiones discretas. El dominio divergente (D7) es un segmento de alrededor de 100 pb localizado en el extremo 3' del gen de *T. cruzi*. Inicialmente, la amplificación por PCR de una secuencia del dominio D7 reveló un dimorfismo cuando el ADN de diferentes cepas de *T. cruzi* eran usadas. Tres diferentes grupos o linajes de cepas de *T. cruzi* pueden ser detectados (Macedo et al., 2004).

Brise y colaboradores amplificando una región en la secuencia de 18S rRNA empleando los cebadores V1 y V2 los cuales tienen como blanco un dominio variable correspondiente a la posición desde 994 a 1164 (de 3' a 5') de *T. cruzi* obtuvieron amplificadores de diferentes tamaños (Brisse et al., 2001; Macedo et al., 2004).

Fragmento amplificado	ASIGNACIÓN DTU					
	DTU I	DTU II	DTU III	DTU IV	DTU V	DTU VI
Mini-exón	350	300	-	-	300	300
24sarRNA	110	125	110	120/125	110	125
18s rRNA	175	165	165	155	165	-

Tabla 2. Tamaño del amplificado de los marcadores y asignación de DTU.

2. JUSTIFICACIÓN

En Colombia a partir de 1999 han sido reportados 11 brotes de Chagas agudo con casos fatales, de los cuales 7 han tenido lugar en el departamento de Santander, afectando los municipios de Lebrija, Piedecuesta, San Vicente, Girón, Sabana de Torres y la ciudad de Bucaramanga. En esta ciudad considerada área de baja endemia se han presentado micro-epidemias de Chagas agudo y casos aislados de probable transmisión oral. Los brotes ocurrieron en los barrios Bucaramanga y Morrórico que se encuentran ubicados en la escarpa de la ciudad, rodeados por bosques de reforestación con presencia de reservorios y vectores silvestres, sin embargo, no fue posible determinar la fuente de infección en dichos brotes (Soto et al., 2014).

Este estudio plantea realizar la caracterización genética de aislados de pacientes, reservorios y vectores de tres zonas de Bucaramanga para establecer los genotipos circulantes en este entorno. Estas zonas forman parte de la escarpa de la meseta de Bucaramanga con un ecotopo similar al de los sitios donde se presentaron los brotes y su estudio aportará información importante de la epidemiología molecular de la zona. Este conocimiento ayudará al mejor entendimiento de la dinámica de transmisión del parásito y permitirá proponer posibles medidas para su control.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar genéticamente aislados de *Trypanosoma cruzi* de humanos, reservorios y vectores de tres zonas de Bucaramanga para conocer los genotipos circulantes.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Identificar la circulación de *T. cruzi* en reservorios, vectores y humanos de tres zonas de Bucaramanga y determinar sus características genéticas.

3.2.2 Establecer la posible relación de los genotipos de *T. cruzi* identificados en los reservorios, vectores y humanos en las zonas de estudio.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo en la ciudad de Bucaramanga, capital del departamento de Santander ubicado al nororiente del país. La ciudad se encuentra en una terraza inclinada de la Cordillera Oriental a 7° 08' de latitud norte respecto al meridiano de Bogotá y 73° 08' de longitud al oeste de Greenwich. La meseta de Bucaramanga está ubicada dentro del valle del río de Oro, comienza por el oriente al pie del Macizo de Bucaramanga, delimitada por el occidente por una escarpa vertical en cuya base comienza una topografía disectada por corrientes de agua intermitentes que dan al territorio una morfología dendrítica. La vegetación de la ciudad corresponde a una zona de vida con transición entre bosque seco tropical y bosque húmedo pre-montano. Presenta una altura sobre el nivel del mar de 959 m, una temperatura media de 23°C y una precipitación media anual de 1.041 mm.

Dentro de los mamíferos más comunes de la zona se encuentran: ardillas, zarigüeyas, puercoespines y roedores (de Bucaramanga, 2003). El muestreo se llevó a cabo en dos viveros que se encuentran bajo protección de la Corporación de Defensa de la Meseta de Bucaramanga, CDMB, ubicados en la escarpa de la ciudad cerca de los barrios San Miguel, Gaitán y en la vereda Santa Bárbara; dichas zonas poseen características similares a los sitios donde ocurrieron los brotes agudos como son ecotopo, reservorios y vectores presentes. Debido a que las zonas de los brotes en la ciudad fueron intervenidas, fumigando las viviendas y los alrededores una vez realizada la investigación de campo, no fue posible realizar el presente trabajo en dichas zonas dado que las condiciones ecológicas habían cambiado.

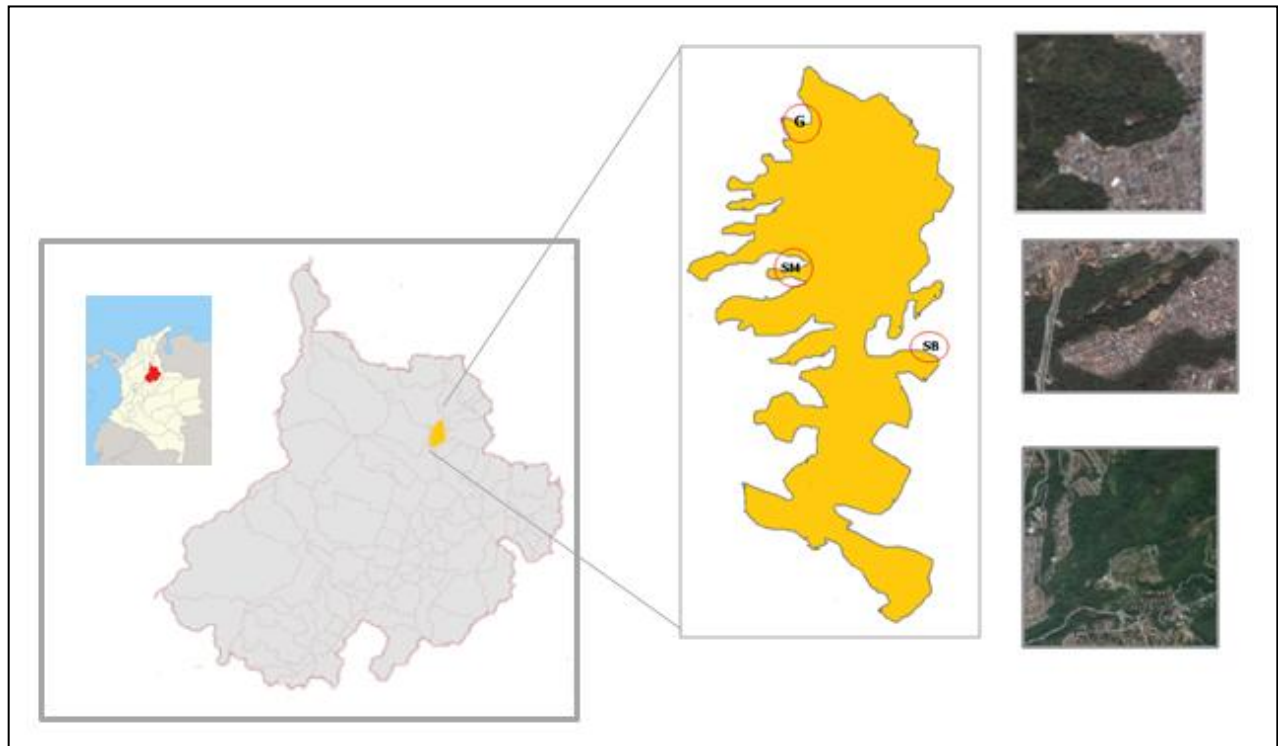


Figura 7. Áreas de estudio. G- barrio Gaitán; SM- barrio San Miguel; SB- vereda Santa Bárbara.

4.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO

4.2.1 Humanos

Se incluyeron los sueros de los habitantes de los barrios en estudio, los cuales acudieron de forma voluntaria, convocados a través de líderes comunitarios.

De un censo poblacional de 3464 individuos se obtuvieron 1148 sueros para la detección de anticuerpos anti- *T. cruzi* utilizando el kit comercial bioelisa CHAGAS de Biokit, el cual presenta una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98%. Los individuos con resultado seropositivo fueron contactados para tomar una segunda muestra para hemocultivo y extracción de ADN.

4.2.2 Reservorios

Se realizó un muestreo aleatorio en zonas boscosas de la escarpa. Se dispusieron transectos lineales de 10 metros, ubicando las trampas en sitios con cobertura forestal como árboles y arbustos. Se emplearon trampas Tomahawk de dos tamaños (30 x 20 x 50cm y 30 x 25 x 70 cm), las cuales fueron cebadas con banano. Las trampas fueron instaladas durante la noche y revisadas a las 6 de la mañana y 5 de la tarde realizando cambio de cebo. Un total de 12 trampas fueron empleadas en cada área muestreada.

Los especímenes capturados se marcaron con tinta indeleble para evitar recapturas y se les tomó muestra de sangre a partir de la vena de la cola, la cual se empleó para cultivo, extracción de ADN y exámen directo, empleando tubos con EDTA y heparina, respectivamente, con un volumen máximo de 3 ml según el tamaño del animal capturado. Una vez realizada la toma de la muestra los individuos fueron liberados en el área de captura.

4.2.3. Triatominos

Los triatominos fueron capturados por la comunidad a través de líderes comunitarios entrenados. Una vez capturados por los habitantes se notificaba al líder y se transportaban al Laboratorio Central de Investigaciones de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander en recipientes plásticos debidamente ventilados para la supervivencia de los insectos. Estos fueron caracterizados por género y especie de acuerdo a las claves de Lent y Wygodzinsky (Lent & Wygodzinsky, 1979). La muestra de heces se obtuvo mediante presión abdominal o se tomó del tracto digestivo con la ayuda de pinzas, para lo cual previamente la parte posterior del insecto fue lavada con solución salina que contenía gentamicina. Las muestras de heces fueron diluídas en solución salina para su observación en fresco con objetivo 40X en busca de la presencia de tripomastigotes.

4.3. AISLAMIENTO DEL PARÁSITO

4.3.1. Hemocultivo

Las muestras de sangre de humanos y reservorios tomadas en tubos con heparina se emplearon para el hemocultivo utilizando medio Novy-Mc Neal-Nicoll (NNN) y medio de cultivo infusión hígado y triptosa (LIT), suplementado con suero bovino fetal al 10% el cual fue previamente inactivado. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2000 rpm por 30 minutos, a continuación se retiró el plasma y se adicionó medio LIT, con éste se realizaron dos lavados de las células y se centrifugó a 2000 rpm por 15 minutos. A continuación se tomó con micropipeta la capa de blancos y se resuspendió en medio LIT en una proporción 1:2, dicha mezcla fue adicionada al tubo con medio NNN agregando 200 µl por cultivo. Los hemocultivos fueron incubados a 28°C, siendo revisados a los 5, 10, 15, 30, 45 y 60 días. Una vez se observó crecimiento en los medios, los parásitos fueron crecidos de forma masiva en medio LIT consiguiendo la fase logarítmica realizando pasajes cada 72 horas (Chiari *et al.*, 1989). Los cultivos que se encontraron en fase logarítmica, se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos, realizando tres lavados. El precipitado resultante fue almacenado a -70°C para posterior extracción de ADN.

4.3.2. Cultivo para el aislamiento del parásito a partir de heces de triatomino

Las muestras de materia fecal se obtuvieron mediante presión abdominal y obtención directa del tracto digestivo con ayuda de pinzas. Este material se cultivó en medio NNN con LIT, suplementado con suero bovino fetal al 10% y se incubó a 28°C. Los cultivos se revisaron cada 24 horas para comprobar crecimiento de parásitos. Una vez se observó crecimiento el cultivo se realizó en medio LIT. Para controlar la contaminación con levaduras o bacterias se utilizaron 500 µg/ml de 5-fluorocitosina y 70 µg/ml de gentamicina (Beltrán *et al.*, 1988). Se realizó la observación entre lámina y laminilla del material para la búsqueda de formas flageladas compatibles con *T. cruzi*.

4.4. Clonación de los aislados

Los aislados fueron clonados por medio del método de plaqueo directo del parásito sobre la superficie del medio de clonación (AGAR-LIT-BHI-Sangre) para lo cual se tomaron parásitos cultivados en medio LIT y se ajustaron a una concentración de 100 parásitos en 100 µl, se agregaron a una caja de Petri que contenía 25 ml de medio sólido y se sembraron por plaqueo. Las cajas fueron incubadas a 37°C hasta por 21 días con revisión periódica hasta observar el crecimiento de colonias puntiformes correspondientes a clones de *T. cruzi*. Cada colonia (clon) fue cultivada en medio LIT de forma independiente a 28°C hasta obtener un volumen mayor a 4 ml (Tanuri *et al.*, 1981).

4.5. Extracción de ADN

Las muestras de sangre total de reservorios y humanos tomadas en tubos con EDTA se utilizaron para la extracción de ADN por el método de *salting out* (Miller, Dykes, & Polesky, 1988). Para ello, las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos, se tomó la capa de blancos y en un vial se adicionó tampón de lisis I (0,32 M de Sucrosa, 10 mM de tris-HCl, 5 mM de MgCl₂, 1% de triton x100) y se agitó vigorosamente con el objetivo de destruir los glóbulos rojos

presentes, se centrifugó y agregó nuevamente tampón hasta obtener un pellet blanco. Posteriormente se adicionó tampón lisis II (50 mM, de NaCl, 10 mM de Tris-Cl pH 7.5, EDTA pH 8.0, 10 mM de SDS) y proteinasa K incubando esta mezcla a 56°C por 30 minutos con el objetivo de lisar las células. El siguiente paso consistió en adicionar 150 µl de acetato de sodio 5M y centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos, para precipitar las proteínas. El sobrenadante fue transferido a otro vial, al cual se adicionaron 600 µl de isopropanol para precipitar el ADN. Este fue centrifugado a 14000 rpm por 4 minutos y se lavó con etanol al 70%. Las muestras de ADN obtenidas se resuspendieron en buffer TE 1X y se almacenaron a -20°C.

Para la extracción de ADN de los parásitos se utilizó igualmente el método de *salting out* a partir de cultivos en fase logarítmica de crecimiento, iniciando en este caso con la adición de buffer de lisis II (WLCB, 10% de SDS y proteinasa K) (Miller et al., 1988).

Las concentraciones de ADN obtenido fueron cuantificadas empleando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 siguiendo las instrucciones del manual de uso y empleando como blanco 2 µl de TE 1x y 2 µl de muestra para cada lectura.

4.6. DETECCIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Para corroborar la infección con *T. cruzi* en las muestras obtenidas en cultivo y la identificación en muestras de sangre y heces de triatomino se realizó amplificación de la secuencia repetitiva del ADN nuclear de 195 pb de *T. cruzi* usando los iniciadores TCZ1 (5' CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3') y TCZ2 (5'TTCTTCAGRGTGTTGG TGTCCAGTG-3'). Para ello, se empleó una solución con un volumen final de 20 µl que contenía 1,5mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,5 µM de iniciadores, 0,6 U de ADN Taq polimerasa, tampón 1X, 30 ng de ADN para muestras de cultivo y 100 ng para muestra de sangre. Se

utilizaron controles positivos y negativos de ADN, así como un blanco de reacción.

4.7. CLASIFICACIÓN DE *T. CRUZI*

La asignación de DTU en las muestras fue realizada de acuerdo a la clasificación establecida en la tabla 2. Para esto el ADN de los cultivos positivos, así como las muestras con presencia de *T. cruzi*, fueron amplificadas utilizando la región intergénica del gen mini exón con los iniciadores TC (5´- CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG 3´); TC1. (5´GTG TCC GCC ACC TCC TTC GGG CC- 3´) y TC2 (5´-CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G -3´). Un producto de amplificación de 350 pb es característico de TcI y una banda de 300 pb es propia de Tc II-VI. La amplificación fue llevada a cabo en una solución con un volumen final de 20 µl empleando contenía 1,5mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,2 µM de iniciadores, 0,6 U de ADN Taq polimerasa, tampón 1X, 30 ng de ADN de cada muestra. Esta caracterización fue confirmada utilizando el marcador 24Sα rARN, empleando los iniciadores D71 (5´- AAGGTG CGT CGA CAG TGT GG 3´) y D72 (5´-TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT-3´). La amplificación fue llevada a cabo en un volumen final de 20 µl, empleando 1,5 mM de MgCl₂ 200 µM de dNTPs , iniciadores 0,5 µM, ADN Taq polimerasa 0,5 U, tampón 1X y 30 ng de ADN de cada muestra. Igualmente se utilizó el marcador ARN 18S rRNA empleando los iniciadores: V1 (5´-CAA GCG GCT GGG TGG TTA TTCCA -3´) y V2 (5´-TTG AGG GAA GGC ATG ACA CATGT- 3´). La amplificación fue llevada a cabo en un volumen final de 20 µl, 1,5 mM de MgCl₂ 200 µM de dNTPs, iniciadores 0,5 µM, ADN Taq polimerasa 0,5 U, tampón 1X y 30 ng de ADN de cada muestra. Las condiciones empleadas en cada una de las amplificaciones se describen en la tabla 3.

Marcador molecular	Denaturación inicial	Número de ciclos	Denaturación	Hibridación	Extensión	Extensión final
TCZ	94°C 5min	40	94°C 20 seg	60°C 10 seg	72°C 30 seg	72°C 7 min
SL-IR	94°C 5min	30	94°C 30 seg	57°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 5 min
24sarRNA	94°C 5min	40	94°C 40 seg	58°C 40 seg	72°C 40 seg	72°C 5 min
18s rRNA	94°C 10min	30	94°C 45 seg	58°C 45 seg	72°C 45 seg	72°C 7 min

Tabla 3. Marcadores empleados para la clasificación de *T. cruzi* y condiciones de reacción.

4.7.1. Electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida

Los productos amplificados fueron corridos en geles de agarosa al 2% en un buffer TAE 1X a 90 voltios durante una hora para los marcadores TCZ y SL-IR. Para los productos del dominio D7 del rRNA 24S α se empleó agarosa *low melt* al 3,5% en tampón TAE 1X a 90 voltios por 90 minutos. Los productos de amplificación del rRNA 18S fueron corridos en geles de poliacrilamida al 10% en tampón TBE 1X durante 6 horas a 90 voltios.

4.8. SECUENCIACIÓN

Para la asignación de los genotipos intra-DTU de TcI, los amplificados de 350 pb de la región intergénica del gen mini exón fueron secuenciados por extensión del iniciador. La secuenciación fue llevada a cabo por el servicio de Macrogen Inc. el cual emplea el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing usando electroforesis capilar y un secuenciador ABI3730XL.

Una vez obtenidas las secuencias se analizó el motivo de la región intergénica del gen mini exón para la asignación de los genotipos de G1 a G26 (C. P. Herrera et al., 2013). Para esto las secuencias se alinearon en ClustalW2 y se realizó su

correspondiente análisis a través del software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 4.0.

4.9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Las muestras humanas empleadas en este estudio fueron tomadas en el estudio primario y se les realizaron las pruebas descritas en el consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética para la Investigación Científica de la Facultad de Salud (CEINCI), en la reunión con acta número 18 realizada el 11 de octubre de 2010.

El manejo de los animales se realizó bajo el permiso ambiental de investigación científica aportado por la Corporación de Defensa de la Meseta de Bucaramanga de acuerdo a la Ley 633 de 2000 y la Resolución 244 de abril 28 de 2009 de la Corporación de Defensa de la Meseta de Bucaramanga (CDMB).

La investigación se clasifica en la categoría de riesgo mínimo, muestras de sangre tomadas por punción venosa correspondiente a 5 ml de sangre y a los individuos seropositivos una segunda punción tomando un máximo de 15 ml de sangre.

Se manejaron microorganismos clasificados en grupo de riesgo tipo II, los cuales fueron manipulados en un laboratorio de microbiología tipo básico empleando una cabina de seguridad durante la manipulación de los cultivos.

5. RESULTADOS

5.1 POBLACIÓN HUMANA

Una vez analizadas las muestras del total de individuos, la seropositividad fue del 2,7%. La población estudiada estuvo conformada por 62% de mujeres y 38% de hombres. El rango de edad en los pacientes seropositivos fue de 34-83 años con una media de 65 años. En el grupo de pacientes seronegativos fue de 0,6-92 años con un promedio de edad de 36 años. En la tabla 4 se observa la distribución de los grupos etáreos en la población general.

A los individuos seropositivos que aceptaron una segunda toma de muestra sanguínea se les realizó hemocultivo y extracción de ADN para la identificación de *T. cruzi* empleando los iniciadores TCZ1 y TCZ2. Ninguno de los individuos seropositivos tuvo hemocultivo positivo o PCR positiva para *T. cruzi* (Figura 8).

Tabla 4 Distribución por edad, individuos muestreados.

Edad	n población total	n serología	%	n seropositivos	% seropositivos
1-6	274	87	31,8	0	0
7-11	293	109	37	0	0
12-16	294	83	28,2	0	0
17-22	318	89	28	0	0
23-29	291	97	33	0	0
30-35	316	93	29	1	1,1
36-41	308	99	32	1	1,0
42-47	283	87	31	0	0,0
48-53	306	105	34	4	3,8
54-60	272	104	38	4	3,8
61-69	257	96	39	5	5,2
70-92	252	97	38	16	16,5
Total general	3464	1146	33	31	2,7

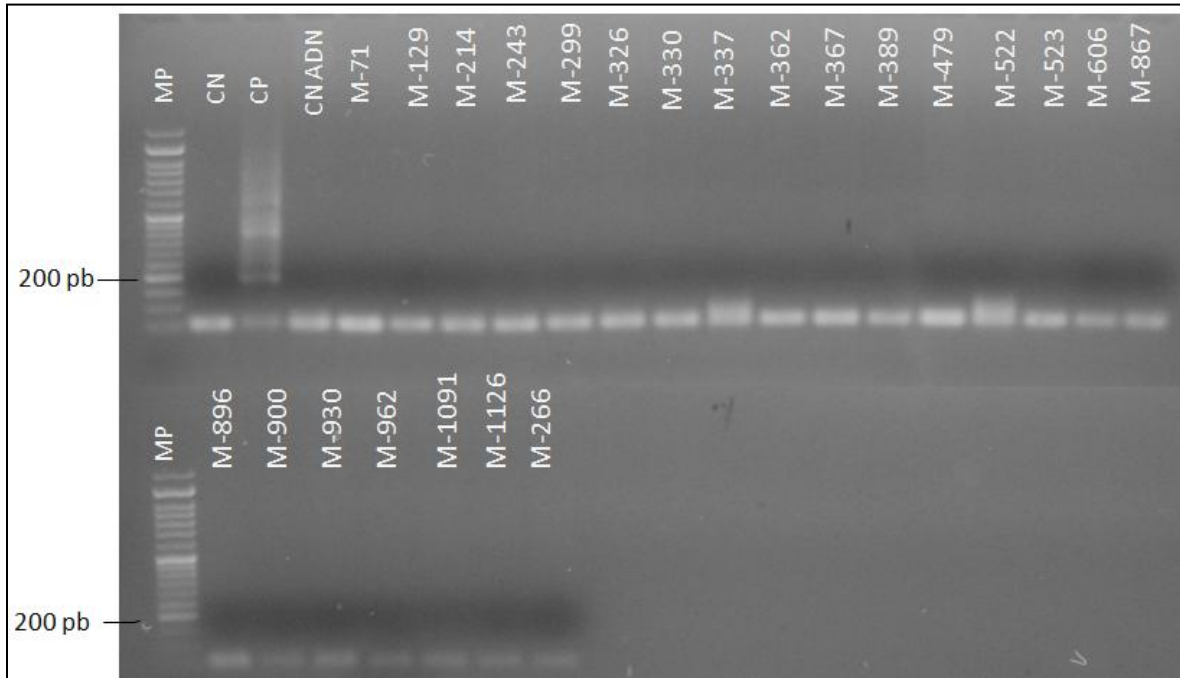


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% PCR-TCZ. MP (Marcador de peso), CN (control negativo), CP (control positivo), CN ADN (control negativo con ADN).

5.2 RESERVORIOS

Entre agosto de 2014 y enero de 2015 se capturaron en total 25 mamíferos, todos ellos pertenecientes al género *Didelphis*, de los cuales el 32% fueron hembras (8/25) y la mitad presentaron crías (Tabla 5).

Tabla 5. *Didelphis marsupialis* capturados en el estudio.

Área estudio	Capturas	Machos	Hembras	Hembras con crías	Positivos
San Miguel	16	10	6	4	8
Gaitán	6	4	2	0	0
Santa Bárbara	3	3	0	0	0
total	25	17	8	4	8



El porcentaje de infección en dichos mamíferos determinado mediante PCR fue del 32% resultando positivas 8 de las 25 muestras tomadas (Figura 9).

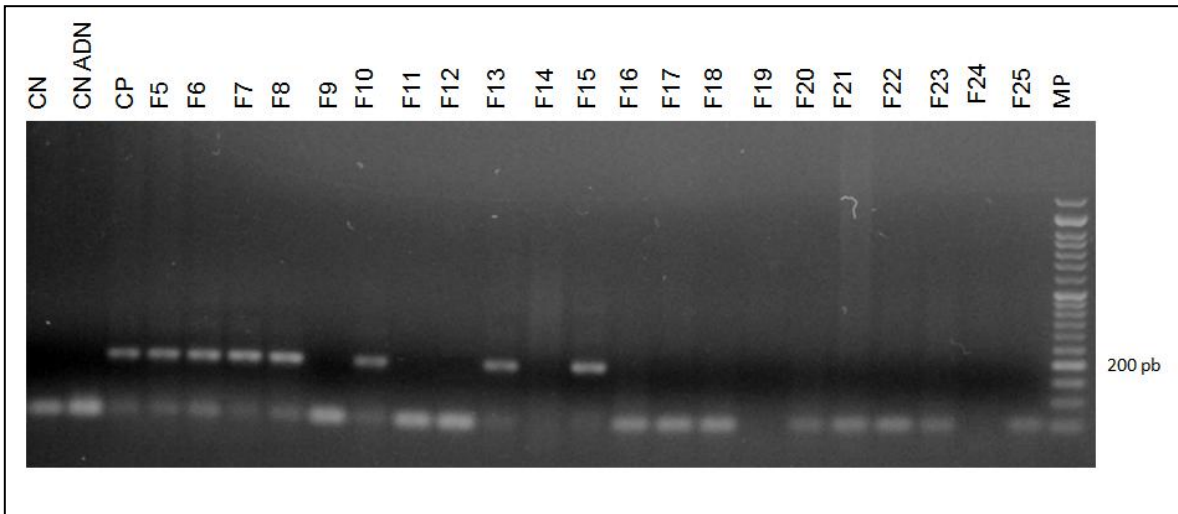


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% PCR-TCZ. MP (Marcador de peso), CN (control negativo), CP (control positivo).

El resultado de los hemocultivos realizados fue positivo para *T. cruzi* en 6 de las muestras con PCR positivas. Los aislados obtenidos fueron clonados y caracterizados, encontrándose todos clasificados como DTU I (Figura 10 y 11).

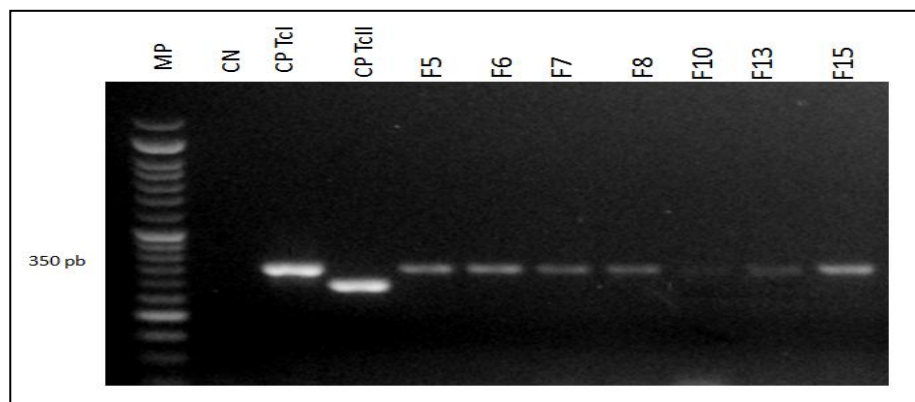


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% PCR mini-exón en muestras TCZ positivas. MP (Marcador de peso), CN (control negativo), CP TCI (control positivo DTU I), CP TCII (control positivo DTU II).

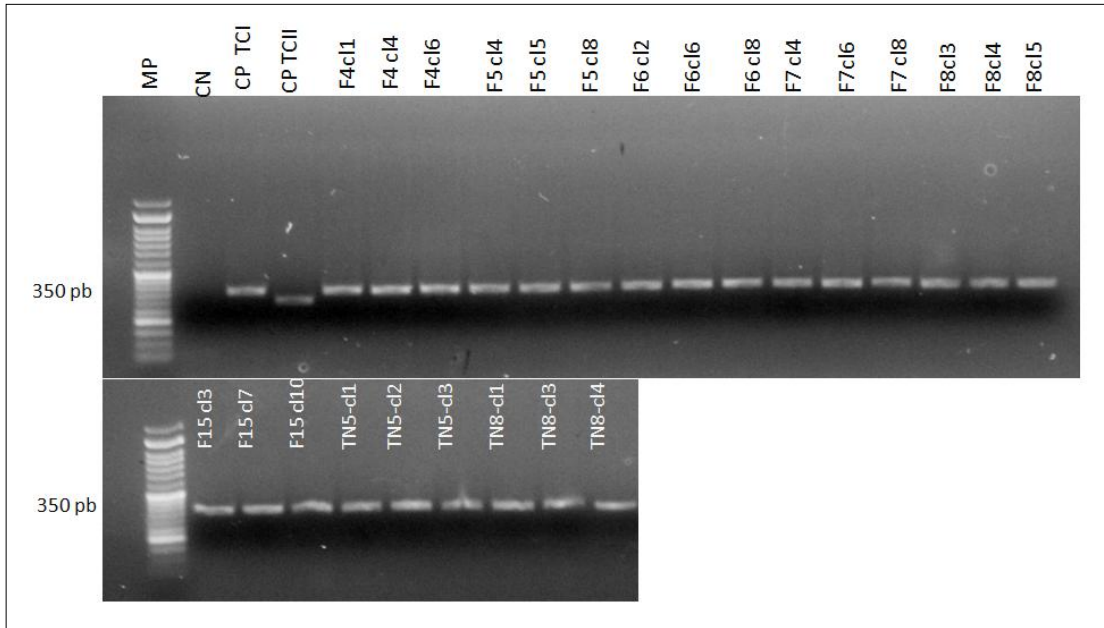


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2% PCR mini-exón clones. MP (Marcador de peso), CN (control negativo), CP TCI (control positivo DTU I), CP TCII (control positivo DTU II).

Al analizar la secuencia microsatélite de la región intergénica del gen mini-exón se encontró que los clones presentaban una repetición (GT)8 (ATGT)2 (AT)1 GT (0) correspondiente al genotipo G2 en 5 de los aislados con sus respectivos clones y repetición (GT)6 (ATGT)1 (AT)1 GT (0) correspondiente a G11 en uno de los aislados, con sus respectivos clones (Figura 14).

5.3 VECTORES

En total se capturaron 36 triatominos los cuales fueron encontrados al interior de las viviendas y fueron identificados como *R. pallescens* y *P. geniculatus*, sin embargo sólo se pudo analizar el contenido de 8 especímenes que se encontraron con vida, todos ellos hembras de *R. pallescens* que presentaron oviposición en el laboratorio (tabla 6).

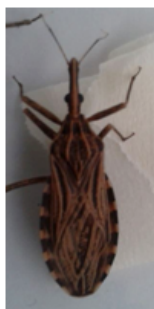
En el análisis de microscopía se detectó la presencia de *Trypanosoma sp.* en 5 muestras. El análisis de PCR mediante la amplificación de ADN repetitivo nuclear de 195 pb, corroboró la especie de las 5 muestras como *T. cruzi* (Tabla 7, Figura 12).

Los cultivos de los especímenes sólo permitieron el aislamiento en 2/5 muestras positivas, las cuales fueron caracterizadas como TcI (Figura 13). El análisis del motivo microsatélite de la región intergénica del mini-exón en los clones correspondió a G2 (Figura 14).

Tabla 6. Área y número de triatominos capturados

	Capturados	Con vida	Especie
Santa Barbará	21	7	<i>R. pallescens</i>
	4	0	<i>P. geniculatus</i>
San Miguel	7	1	<i>R. Pallescens</i>
Gaitán	4	0	<i>R. Pallescens</i>
Total	36	8	

Tabla 7. Análisis triatominos capturados con vida. MO (Positivos por microscopía), PCR (TCZ positiva).



Triatominos	n	MO	PCR	aislados	DTU	Genotipo
<i>R. pallescens</i>	8	5	5	2	TcI	G2

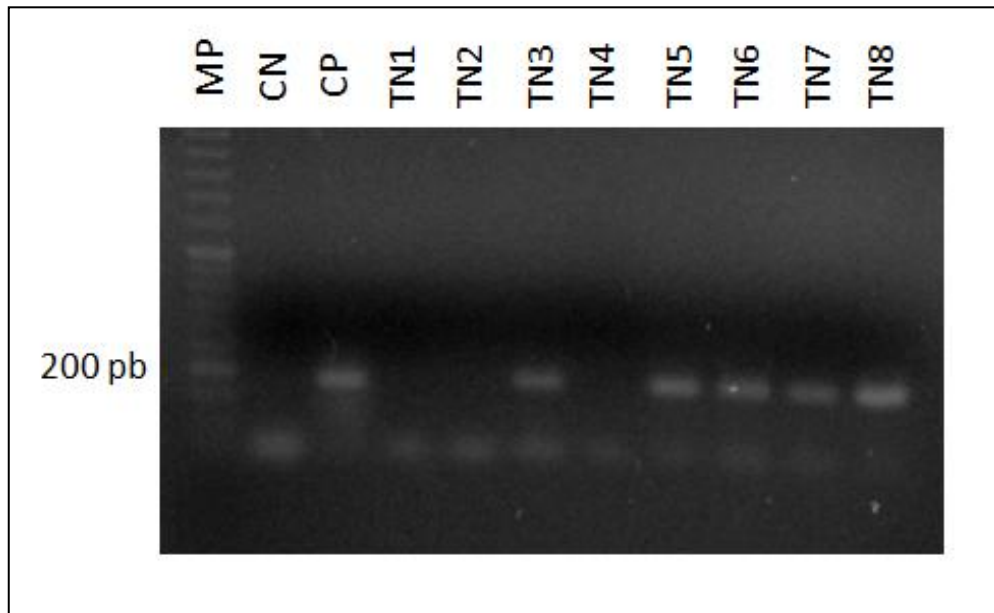


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2% PCR-TCZ. MP (Marcador de peso), CN (control negativo), CP (control positivo).

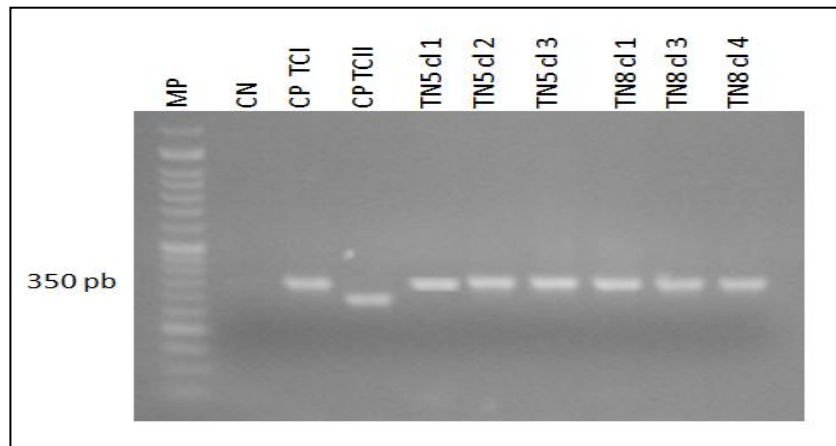


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2% PCR mini-exón clones. MP (Marcador de peso), CN (control negativo), CP TCI (control positivo DTU I), CP TCII (control positivo DTU II).

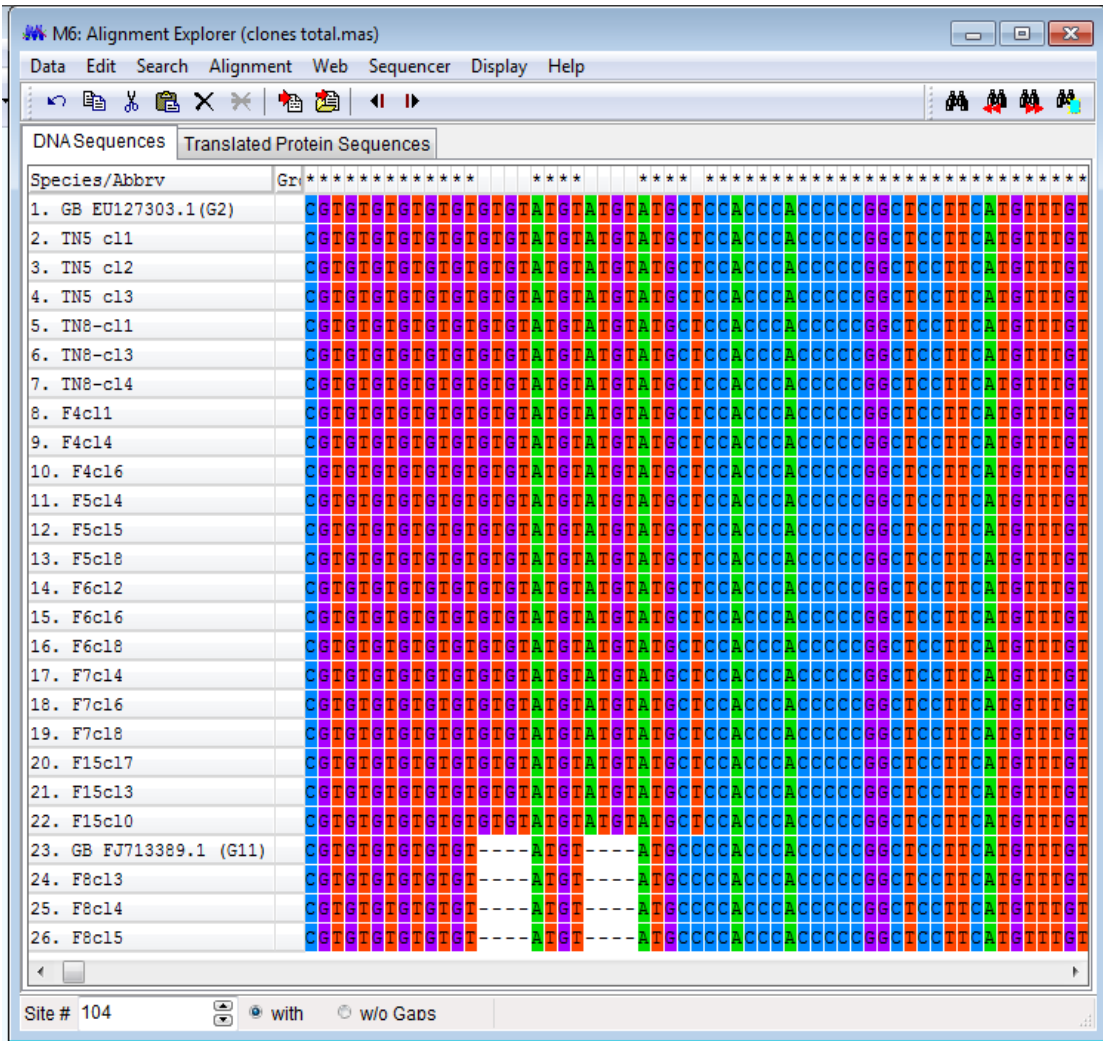


Figura 14. Secuencias motivo micro satélite, Región intergénica gen mini- exon. GB FJ713389.1: genotipo de referencia G2. GB EU127303.1: genotipo G11
 F4-F8, F11: aislados de *Didelphis* y sus clones. TN: aislados de triatomínicos y sus clones.

6. DISCUSIÓN

En Colombia diferentes trabajos han estimado la seroprevalencia en humanos de infección por *T. cruzi* en distintas zonas del país. Cantillo-Barraza y colaboradores en 2014 determinaron la seroprevalencia en cinco municipalidades de la región Caribe, encontrando 1,7% de infección. Las características eco-epidemiológicas en estos municipios como son, transmisión relacionada con la presencia de vectores secundarios en las áreas de estudio y presencia de *Didelphis* infectados se asemejan a las condiciones en las zonas estudiadas por el presente trabajo, el cual determinó una seroprevalencia de 2,7%. Por otra parte y con resultados similares a nuestro estudio, Saldaña y colaboradores encontraron una seroprevalencia en humanos de 2,3% (24/1056). Sin embargo, dicho estudio fue llevado a cabo en área rural de una zona endémica de Panamá donde los casos se establecieron como autóctonos y se determinó la presencia de *R. pallescens* y *D. marsupialis* infectados en las áreas estudiadas (Cantillo-Barraza *et al.*, 2014; Saldaña *et al.*, 2012). En contraste con estos hallazgos, se ha reportado una seroprevalencia superior a la nuestra en la región momposina (16,8%) y en la Sierra Nevada (37%), donde se evidencia una gran densidad vectorial y presencia de triatomíneos domiciliados respectivamente. Estas condiciones son diferentes a las encontradas en nuestro entorno, caracterizado por una menor presencia de vectores, los cuales son principalmente intrusos (Mejía-Jaramillo *et al.*, 2012; Vásquez *et al.*, 2013).

Lima y colaboradores en un estudio realizado en un área periurbana del estado de Ceará al noreste de Brasil reportaron una seroprevalencia del 1,2% en humanos. Al igual que en este trabajo en los individuos menores de 10 años no se detectó infección mediante pruebas serológicas, evidenciando el éxito de las medidas de control implementadas en ese país en los años 90s (Lima *et al.*, 2012). Igualmente, en el área estudiada en este trabajo parece no presentarse una transmisión activa en humanos, evidenciada por la ausencia de seropositividad en menores de edad, sin embargo, los resultados de seroprevalencia son

comparables con lo encontrado en áreas de transmisión activa, esto puede deberse a fenómenos de migración ocurridos desde municipios endémicos. En Bucaramanga datos del DANE reportan que en la ciudad el 39,9% de la población había nacido en otro país o municipio. De igual forma el DANE registró que el 9,5% de la población manifestaba encontrarse en otro municipio 5 años atrás. Esto muestra la migración como un fenómeno importante en esta ciudad (DANE, 2005). En los individuos estudiados el 36% nacieron fuera de Bucaramanga y el 27% manifiesta haber vivido en un municipio diferente. Del total de individuos seropositivos el 70% nacieron en otro municipio y el 64% ha vivido en otros municipios muchos de estos considerados de alta endemia como es el caso de los municipios de San Vicente, Mogotes, Capitanejo y Rionegro, entre otros.

Este fenómeno de migración ha sido reportado como un factor a tener en cuenta en el estudio de la enfermedad de Chagas dado que ha dado lugar a la urbanización de la enfermedad (Moscatelli et al., 2015; Moscatelli et al., 2013). Un ejemplo de esto es lo ocurrido en la ciudad de Buenos Aires la cual es centro de concentración de un flujo migratorio significativo desde países y regiones endémicas. En la ciudad no se presenta transmisión vectorial, sin embargo el perfil poblacional sugiere que hay una alta probabilidad de encontrar mujeres infectadas con *T. cruzi* y potencial fuente de casos congénitos (Moscatelli et al., 2015). De forma similar los países no endémicos presentan una emergencia de la enfermedad, cuya importancia depende del volumen del flujo migratorio y el lugar de procedencia de los individuos, en dichos países la transmisión ocurre a través de transfusión sanguínea o trasplante a partir de donantes infectados así como de madres infectadas a sus hijos. En muchos de estos países se han establecido medidas de control para evitar la transmisión vertical, así como medida de control para evitar el riesgo de infección en bancos de sangre (Pinazo et al., 2015; Requena-Méndez et al., 2014). En el presente estudio los individuos seropositivos no presentaron PCR o cultivo positivo para *T. cruzi*. Esto puede deberse a que estos individuos se encuentran en la fase crónica de la enfermedad, por lo tanto las parasitemias son bajas e irregulares (Pérez et al., 2015; Sangenis et al., 2015).

En relación con los datos de los reservorios silvestres, se conoce a *Didelphis* como una especie generalista, sinantrópica, bien adaptada a los ambientes urbanos y periurbanos, lugares en los cuales puede alcanzar densidades poblacionales más altas que en los ambientes silvestres (das Chagas *et al.*, 2012; Mackenstedt *et al.*, 2015). Uno de los factores que contribuyen a esto, son la fuente de alimento disponible, lo cual da lugar al incremento en la natalidad y tasa de supervivencia, este fenómeno se observó en las áreas de estudio pues se encontró que la comunidad de estos barrios tiende a arrojar restos de comida hacia la escarpa, de igual forma la presencia de 4/8 hembras con cría al momento de la captura soporta un aumento en la reproducción de *Didelphis* en la zona estudiada. Las trampas utilizadas fueron para mamíferos de tamaño mediano y pequeño, sin embargo solo fue posible capturar especímenes de *D. marsupialis*, lo cual refleja su predominio en estas zonas.

La alta frecuencia de especies generalistas como es el caso de *D. marsupialis* intensifica la posibilidad de transmisión de parásitos debido a la presencia de hospederos jóvenes, los cuales son más susceptibles a la infección (Mackenstedt *et al.*, 2015) conllevando un incremento de triatomíneos infectados, dado que los *Didelphis* son su principal fuente de alimento (Jaramillo *et al.*, 2000). Esto da lugar a una mayor oportunidad de contacto entre vectores infectados, animales domésticos y humanos (Cantillo-Barraza *et al.*, 2014; das Chagas Xavier *et al.*, 2012). En *Didelphis* además de lo anterior, otro factor que contribuye al aumento de transmisión es su carácter nómada (Gottdenker *et al.*, 2012).

El hallazgo de hemocultivos positivos (6/25) en los reservorios estudiados muestra una circulación activa del parásito lo cual favorece la transmisión hacia el vector durante la alimentación de este. La transmisión también puede tener lugar a través de la manipulación de la zarigüeya cuando es empleada para el consumo de su carne (Roque *et al.*, 2013). Algunos investigadores consideran que una alta tasa de hemocultivos positivos es un factor para considerar a un mamífero como reservorio importante de *T. cruzi* sin importar la densidad de este en un área determinada (Herrera *et al.*, 2005). En el presente estudio se encontraron 2

muestras con PCR positiva y hemocultivo negativo, lo cual se puede deber a la carga del parásito presente en estos individuos o a la sensibilidad propia del hemocultivo.

Estudios realizados en una área periurbana de Brasil reportaron 67% de hemocultivos positivos con *T. cruzi* en muestras de *D. alvibentris* siendo más alto que lo encontrado en el presente estudio (33%), lo cual puede deberse a diferencias en la endemia de cada zona ya que la ciudad de Bucaramanga es considerada un área de baja endemia (Lima et al., 2012). Por otra parte, estos resultados podrían estar influenciados también por la sensibilidad de las pruebas como se reportó en un estudio realizado en zona rural del Orinoco colombiano de alta endemia, en el cual se encontró un índice de infección de 21% en 24 especímenes de *D. marsupialis* capturados, determinado por microscopia y hemocultivo (Rendón et al., 2015). En un análisis de la infección con *T. cruzi* en *D. marsupialis* determinada mediante PCR y xenodiagnóstico en una zona rural del Caribe colombiano se encontró un 86,3% (19/22) de muestras positivas. Estas diferencias en la tasa de infección de igual forma pueden deberse a la endemia propia de la zona (Cantillo-Barraza et al., 2014).

En las zonas de estudio se determinó la seroprevalencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en *Canis familiaris* propiedad de los habitantes de los barrios, encontrándose un 25% de individuos seropositivos, sin presencia de hemocultivo o PCR positiva. Estos animales podrían haber adquirido la infección ya sea a través de una lesión o por medio de la ingestión directa del vector o a través de alimentos contaminados (95), mostrando la exposición a *T. cruzi* por parte de los humanos y el riesgo de transmisión en la zona de estudio (Vásquez et al., 2013; Roque et al., 2013; Lima et al., 2012).

En el caso de los vectores fueron capturadas dos especies de triatominos, *R. pallescens* y *P. geniculatus*, los especímenes colectados no habían establecido colonias en las viviendas, mostrando su intrusión a las mismas. Sin embargo, las capturas correspondieron a hembras con oviposición las cuales pudieron migrar

en búsqueda de alimento lo cual podría favorecer un proceso de domiciliación, no obstante dicho proceso es un proceso evolutivo que se da gradualmente y que requiere de mucho tiempo dado que implica no solo cambios genotípicos sino también cambios fenotípicos. Actualmente es claro que las especies de triatomíneos con bajos niveles de domiciliación tienen un rol importante en la transmisión de *T. cruzi* a los humanos, debido a que triatomíneos provenientes de áreas selváticas contribuyen a la re-infestación que podría darse en las áreas estudiadas consistente con el hallazgo de un 62% de infección en los triatomíneos analizados (Waleckx *et al.*, 2015). La pérdida de fuentes naturales de alimento favorece que los triatomíneos se desplacen hacia el domicilio y el peridomicilio (Coura *et al.*, 2014).

La captura de los triatomíneos por parte de la comunidad permitió evidenciar la presencia de triatomíneos intrusos en las viviendas de las áreas de estudio, sin embargo esta metodología presentó inconvenientes pues dió lugar a la recolección de especímenes secos, en los cuales no fue posible evaluar la presencia de *T. cruzi* limitando los resultados de infección obtenidos a nivel vectorial.

En los casos de transmisión vectorial los principales vectores reportados en Colombia son *R. prolixus* y *T. dimidiata* debido a su amplia distribución, tasa de infección e índices de colonización. Sin embargo, en las áreas donde no hay especies domiciliadas y se han presentado brotes como lo ocurrido en Santander, se ha sugerido la participación de vectores secundarios como *R. pallenscens* y *P. geniculatus* (Gómez-Melendro *et al.*, 2014) que fueron los vectores identificados en nuestro estudio. Los casos humanos se pueden presentar de forma esporádica debido a la intrusión de triatomíneos a los domicilios sin que se presente una colonización (Soto *et al.*, 2014) como se plantea ocurre en los brotes orales, motivo por el cual cualquier especie silvestre que contamine los alimentos al interior de una vivienda estaría implicada en este tipo de transmisión (Díaz *et al.*, 2014; Rueda *et al.*, 2014).

A nivel de Colombia, estudios en la región momposina llevados a cabo por Vásquez y colaboradores en los cuales analizaron 27 insectos de la especie *R. pallescens* recolectados en época seca y 39 en época de lluvia, encontraron 74 y 48,7%, de infección con *T. cruzi* respectivamente (Saldaña et al., 2012). Soto y colaboradores analizando los hallazgos entomológicos de un brote ocurrido en Aguachica Cesar en 2010 encontraron un índice de infección del 54,2% con *Trypanosoma sp* para *R. pallescens*, siendo índices de infección similares a los encontrados para esta especie en el presente trabajo (Soto et al., 2014).

En Centroamérica diversos estudios han reportado una alta infección en *R. pallescens* (Saldaña et al., 2012; Vásquez et al., 2004, Zeledon et al., 2006), como un estudio de eco-epidemiología realizado en Panamá, el cual encontró un índice de infección del 45% en 168 especímenes analizados y determinó mediante el análisis del contenido intestinal a la zarigüeya como principal fuente de alimento, encontrándose en el 82% de los insectos muestreados (Vasquez et al., 2004). Zeledón en 2006 encontró una infección del 41,9% en 43 insectos pertenecientes a *R. pallescens* en un estudio realizado en Costa Rica y Nicaragua (Zeledón et al., 2006). Saldaña al oeste de Panamá determinó un índice de infección del 68% en *R. pallescens* donde el 54,7% (88/161) se alimentaron de *D. marsupialis* y reportó DTU I circulando en estos vectores (Saldaña et al., 2012). Los índices de infección observados en nuestro estudio presentan resultados similares a los reportados, tanto en Colombia como en Centroamérica. Estas investigaciones resaltan que esta especie de triatomino invade las viviendas sin presentar domiciliación como se observó en nuestro estudio, sin embargo las poblaciones de vectores capturadas en dichos estudios son mayores que las nuestras.

Igualmente, *P. geniculatus* se alimenta de *D. marsupialis* y presenta altas tasas de infección y puede estar implicado en la contaminación de alimentos como fue evidenciado en el estudio entomológico realizado en Aguachica y en los estudios de Saldaña realizados en Panamá (Saldaña et al., 2012; Soto et al., 2014). Del mismo modo, Carrasco y colaboradores analizando los vectores involucrados en

los brotes orales ocurridos en Venezuela detectó la circulación de esta especie en ambientes urbanos implicando su participación en dichos brotes. Esta especie es la que predomina en el distrito metropolitano de Caracas y representa un riesgo debido a las altas tasas de infección (76%), por lo cual es una especie a tener en cuenta en el proceso de transmisión del parásito (Carrasco *et al.*, 2014; Muñoz-Calderón *et al.*, 2013; Soto *et al.*, 2014).

Modelos matemáticos, así como estudios de campo, han mostrado que la infestación se da con una significancia mayor a nivel de las casas localizadas en la periferia de una población en comparación con las casas ubicadas en el centro (Waleckx *et al.*, 2015). Este fenómeno descrito como el “fenómeno borde” muestra como los bordes de los hábitats cambian la interacción entre especies y es un factor de riesgo común encontrado en la mayoría de los brotes ocurridos en las ciudades de la amazonia brasilera y en Venezuela, usualmente localizadas en proximidad de áreas con abundante vegetación (de Noya & González, 2015; Ribeiro Jr *et al.*, 2015). Del mismo modo los brotes presentados en la meseta de Bucaramanga ocurrieron en zonas ubicadas en la periferia de la ciudad con cercanía a zonas boscosas (Díaz *et al.*, 2015). Por lo tanto, la proximidad a los bosques es uno de los mayores factores de riesgo que conducen al contacto vector-humano (Barbu *et al.*, 2010; Ribeiro Jr *et al.*, 2015; Ramirez *et al.*, 2010). Otros factores que influyen en la infestación son la atracción por la luz así como la presencia de animales domésticos y la fuente de alimento. Se considera que bajo estos factores las condiciones de calidad y nivel socioeconómico de la vivienda no juegan un rol significativo (Dumonteil *et al.*, 2013).

Ante la presencia de fenómenos de intrusión por parte de vectores secundarios, el abordaje para el control vectorial no implicaría la fumigación con insecticida al interior de las viviendas sino los esfuerzos deben centrarse en evitar la entrada del triatomino a las casas con medidas como impregnar las cortinas con insecticida o instalación de mosquiteros en las ventanas (Waleckx *et al.*, 2015).

De igual forma las recomendaciones para áreas donde no hay transmisión doméstica pero persiste la transmisión zoonótica son: i) evitar dejar encendidas luces artificiales durante la noche, ii) llevar a cabo limpiezas periódicas en palmas que se encuentren cercanas a las viviendas, iii) instalar mosquiteros en las ventanas. Además campañas de educación que sensibilicen a la comunidad sobre el riesgo de infección por *T. cruzi*, así como proporcionar alternativas para evitar el contacto vector-humano (Ribeiro Jr et al., 2015). Otra medida importante es la educación de las comunidades respecto al riesgo que representan las viviendas ubicadas en la periferia de la ciudad (de Noya et al., 2009).

Los aislados obtenidos de reservorios en el presente estudio fueron caracterizados como TcI, sin embargo no se encontraron otras DTU como TcII reportada previamente en el departamento de Santander en sangre y tejidos de pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica (González et al., 2010; Mantilla et al., 2010; Zafra et al., 2008). Jansen y colaboradores mencionan que *Didelphis* sp es capaz de mantener parasitemias altas y prolongadas causadas por TcI (hemocultivos positivos) pero controlan las parasitemias causadas por TcII hasta niveles indetectables (Jansen & Roque, 2015). De igual forma Gürtler resalta que TcI está extendido a través de América en asociación con las zarigüeyas lo cual soporta nuestros hallazgos (Gürtler & Cardinal, 2015).

En cuanto a los resultados del análisis de la secuencia del gen de mini-exón se identificaron los genotipos intra-DTU G2 en el 5/6 de reservorios y en los dos vectores analizados y G11 en 1/6, los cuales corresponden a los haplotipos Ib y Id respectivamente (Herrera et al., 2013). Herrera analizó 244 secuencias de países de Latinoamérica de las cuales 86 corresponden a secuencias de Colombia empleando reportes de diferentes autores, agrupándolas en 13 genotipos, siendo los más frecuentes G2, G7 y G11. De acuerdo a estos datos, el genotipo G2 no presenta una asociación con un ciclo de transmisión en particular y se encontró en 6 especies diferentes de triatomíneos siendo uno de estos *R. pallenscens*, especie en la cual G2 fue el genotipo más frecuente 58% (7/12). La frecuencia observada de G2 en *Didelphis* en el presente trabajo podría estar relacionada con la

presencia de G2 en *R. pallescens* lo cual estaría acorde con la estrecha relación que se presenta entre este vector y dicho reservorio. Resultados similares fueron observados por los estudios realizado por Cantillo-Barraza en el año 2014, en el cual caracterizó como Tc1b (G2) parásitos obtenidos de *R. pallescens* así como de *D. marsupialis* capturados en diferentes municipios de la región Caribe colombiana y el reporte en dicha especie de triatomino por Soto en Aguachica (Cantillo-Barraza et al., 2014; Soto et al., 2014). Otros estudios como el de Muñoz en Venezuela han reportado la presencia de *Panstrongylus geniculatus* infectados con Tc1b (G2) a nivel peridoméstico y selvático (Muñoz-Calderón et al., 2013).

El presente estudio encontró también G11 (Tc1d) a nivel de un *Didelphis* en un reservorio, Herrera reportó este genotipo como el más frecuente en esta especie a nivel selvático a partir de muestras provenientes del departamento de Tolima (Falla et al., 2009; Herrera et al., 2007). A su vez, Muñoz encontró Tc1d como la DTU más importante entre los aislados de diversos brotes ocurridos en Venezuela (Falla et al., 2009; Herrera et al., 2013; Muñoz-Calderón et al., 2013). Sin embargo, estudios recientes realizados en el Caribe colombiano no han detectado este genotipo al estudiar reservorios y vectores (Cantillo-Barraza et al., 2014; Soto et al., 2014).

El estudio de Herrera reporta los genotipos G2 y G11 en *P. geniculatus*. Sin embargo en nuestro estudio no fue posible establecer genotipos en esta especie debido a las condiciones del material a analizar. A pesar de esto, es de resaltar que los genotipos descritos como más frecuentes en Colombia coinciden con lo encontrado en las áreas de estudio.

Estudios llevados a cabo en la Sierra Nevada de Santa Marta realizados en humanos, reservorios y vectores detectaron Tc1a, Tc1b y Tc1d los cuales no presentaron una asociación a un ciclo en particular, al contrario se encontró un solapamiento del ciclo selvático y doméstico (Mejía-Jaramillo et al., 2014).

Debido a la ausencia de aislados en humanos y al bajo número de aislados a nivel de reservorios y vectores no fue posible establecer una relación humano- vector-

reservorio. Sin embargo en las muestras analizadas se observó una mayor frecuencia de G2 tanto en reservorios como en vectores que podrían estar sugiriendo una circulación de este genotipo. Esto podría estar asociado con lo reportado en estudios realizados en los casos humanos de Chagas agudo de probable transmisión oral ocurridos en Santander, en los cuales se identificaron estos mismos genotipos, G2 asociado con los brotes de Chagas agudo en barrios periféricos de Bucaramanga y G11 asociado con brotes de zonas rurales (Díaz *et al.*, 2015).

7. CONCLUSIONES

En reservorios pertenecientes a la especie *Didelphis marsupialis* y en el vector *R. pallescens* se encontró la presencia de *Trypanosoma cruzi* DTU I, genotipo G2. El genotipo G11 solo fue hallado a nivel del reservorio silvestre *Didelphis marsupialis*.

Los resultados serológicos en humanos sugieren que en las áreas en estudio no se presenta infección activa debido a la ausencia de individuos menores de edad seropositivos, sin embargo, residen individuos seropositivos provenientes de áreas endémicas.

Los hallazgos permiten concluir que en el área existe la presencia de reservorios periurbanos principalmente *D. marsupialis* y vectores como *R. pallescens* infectados, lo cual conduce a la persistencia de riesgo de micro-epidemias de la enfermedad de Chagas.

El principal reservorio en la escarpa de Bucaramanga fue *D. marsupialis*. Es posible que los vectores se encuentren conviviendo próximos a los reservorios y lleguen a las casas atraídos por la luz y fuente de alimento.

Dado que muchos de los vectores fueron hembras con oviposición se sugiere que en el área estudiada se podría estar generando un proceso de domiciliación, permitiendo que los animales domésticos se infecten por sus características insectívoras. Sin embargo como fue planteado en la discusión este proceso de domiciliación se da de forma gradual.

8. RECOMENDACIONES

Se sugiere ampliar el estudio realizado hacia todos los barrios que presentan viviendas en límites con la escarpa de la ciudad, incluyendo el muestreo de humanos, vectores y reservorios silvestres.

Incluir el muestreo de reservorios domésticos para establecer su papel en el ciclo de transmisión.

Disponer trampas para vectores en las áreas de estudio, con una revisión periódica de forma que se garantice la viabilidad de los triatominos.

Implementar estrategias de muestreo que permitan aumentar la sensibilidad del cultivo en el caso de los humanos.

La presencia de individuos seropositivos provenientes de áreas endémicas, implica que en la ciudad se deberían implementar tamizajes serológicos en todas las escuelas e igualmente adelantar el Programa de Chagas congénito en mujeres seropositivas en edad reproductiva.

BIBLIOGRAFÍA

ALCALDIA DE BUCARAMANGA. [Citado el 12 de jun de 2015]. Disponible desde: <http://www.bucaramanga.gov.co/Contenido.aspx?Param=9>

ANDRADE, Sonia G and Juracy B MAGALHÃES. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1997;30(1):27-35.

BACAL, Fernando *et al.* Transplantation for Chagas' disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. *Clinical transplantation*. 2010;24(2):E29-E34.

BARBU, Corentin, Eric DUMONTEIL, and Sébastien GOURBIÈRE. Characterization of the dispersal of non-domiciliated *Triatoma dimidiata* through the selection of spatially explicit models. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8):e777.

BELTRÁN, Sofía Duque *et al.* Aislamiento de *Trypanosomas* a partir de materia fecal de *Rhodnius prolixus*. *Biomédica*. 1988;8(1-2):37-9.

BERN, Caryn, & SUSAN P. MONTGOMERY. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;49(5):e52-e4.

BITTENCOURT, Achiléa *et al.* Transmissão vertical da doença de Chagas. *Rev Patol Trop*. 2000;29:101-15.

BRENER Zigman. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Reviews in Microbiology*. 1973;27(1):347-82.

BRISSE, Sylvain, Jan VERHOEF & Michel TIBAYRENC. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International Journal for Parasitology*. 2001;31(11):1218-26

BRISSE, Sylvain, Christian BARNABÉ & Michel TIBAYRENC. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International journal for parasitology*. 2000;30(1):35-44.

CANTILLO-BARRAZA, Omar *et al.* *Trypanosoma cruzi* transmission in a Colombian Caribbean region suggests that secondary vectors play an important epidemiological role. *Parasites Vectors*. 2014;7:381.

CARDINAL, Marta V *et al.* Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *International Journal for Parasitology*. 2008;38(13):1533-43.

CARRASCO, Hernán J., *et al.* Panstrongylus geniculatus and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: high risk factors for Chagas' disease transmission in the Metropolitan District of Caracas, Venezuela. *Parasites & vectors*. 2014;7(1):1-15.

CORREDOR A. Situación epidemiológica de la tripanosomiasis americana en Colombia. Curso taller nacional de la enfermedad de Chagas Bucaramanga, CINTROP. 1993.

COURA, José Rodrigues . Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013;108(8):962-7.

COURA JR. Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102:113-22.

COURA, José Rodrigues, Pedro Albajar Viñas & Angela CV Junqueira. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2014;109(7):856-62.

CUARTAS-CALLE, Carlos & Javier MUÑOZ ARANGO. Marsupiales, cenoléstidos e insectívoros de Colombia: Editorial Universidad de Antioquia; 2003.

CURA, Carolina I *et al* *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions & transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *International Journal for Parasitology*. 2010;40(14):1599-607.

CHIARI, Egler *et al.* Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1989;22(1):19-23.

DA SILVEIRA Anacleto TC. Food habits of four armadillo species in the Cerrado area, Mato Grosso, Brazil. *Zoological Studies-Taipei*-. 2007;46(4):529.

DANE. Censo general 2005. [citado el 10 de septiembre de 2015]. Disponible desde:
<https://www.dane.gov.co/files/censo2005/perfiles/santander/bucaramanga.pdf>

DAS CHAGAS Xavier *et al.* Lower richness of small wild mammal species and Chagas disease risk. 2012.

DE LANA M, Machado EMdM. 14 - Biology of *Trypanosoma cruzi* and Biological Diversity. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. American Trypanosomiasis. London: Elsevier; 2010. p. 339-63.

DE NOYA, Belkisyolé Alarcón *et al.* Transmisión urbana de la enfermedad de Chagas en Caracas, Venezuela: aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. Rev Biomed. 2009;20:158-64.

DE NOYA, Belkisyolé Alarcón *et al.* An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. Acta Tropica. 2015.

DÍAZ F *et al.* Microbiología de las infecciones humanas. Editorial CIB Medellín, Colombia. 2007.

DÍAZ, Martha L.; GONZÁLEZ, Clara I. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud. 2014;46(2):177-88

DÍAZ, Martha Lucía *et al.* Acute chagas outbreaks: molecular and biological features of *Trypanosoma cruzi* isolates, and clinical aspects of acute cases in Santander, Colombia. Parasites & vectors. 2015;8(1):1-14.

DUMONTEIL, Eric *et al.* Eco-bio-social determinants for house infestation by non-domiciliated *Triatoma dimidiata* in the Yucatan Peninsula, Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, vol. 7, no 9, p. e2466.

FALLA *et al.* Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. Acta Tropica. 2009;110(1):15-21.

GARCIA, Hector H *et al.* Neuroparasitology and Tropical Neurology: Handbook of Clinical Neurology Series (Editors: Aminoff, Boller, Swaab): Newnes; 2013.

GARDNER Alfred. Order Didelphimorphia. Vol I: 3-18. Mammal Species of the World, Third Edition (Wilson DE and DM Reeder, eds) John Hopkins University Press, Baltimore, MD[Links]. 2005.

GÓMEZ-MELENDRO, Edith Natalia *et al.* First Record *Triatoma maculata* (Erichson,1848)D(Hemiptera: Reduviidae: Triatomini)Din the Municipality Riohacha,La Guajira– Colombia. Frontiers in Public Health. 2014;2.

GONZÁLEZ C, Ortiz S, Solari A. Colombian *Trypanosoma cruzi* major genotypes circulating in patients: minicircle homologies by cross-hybridization analysis. *International journal for parasitology*. 2010;40(14):1685-92.

GONZALEZ, Antonio, *et al.* Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984;81(11):3356-60.

GOTTDENKER Nicole L *et al.* Host life history strategy, species diversity, and habitat influence *Trypanosoma cruzi* vector infection in changing landscapes. 2012;6(11).

GUHL, Felipe & Juan David RAMÍREZ. Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*. 2013;20:148-54.

GÜRTLER, Ricardo E., & CARDINAL, M. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi* . *Acta tropica*. 2015.

GUTIERREZ R *et al.* Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. *Parasitology*. 2004;129(04):439-44.

HANFORD Elaine Jennifer *et al.* Chagas Disease: Environmental Risk Factors. In: Nriagu JO, editor. *Encyclopedia of Environmental Health*. Burlington: Elsevier; 2011. p. 553-65.

HERNÁNDEZ, Libia Milena, *et al.* Brote de Chagas agudo en Lebrija, Santander, 2008. *Revista del Observatorio Salud Pública de Santander*. 2009;4:28-36.

HERRERA C, Bargues MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, *et al.* Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*. 2007;7(4):535-9.

HERRERA, Claudia Patricia *et al.* Complex evolutionary pathways of the intergenic region of the mini-exon gene in *Trypanosoma cruzi* TcI: a possible ancient origin in the Gran Chaco and lack of strict genetic structuration. *Infection, genetics and evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 2013 ; 16:27-37.

HERRERA L *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;99(5):379-88.

HERRERA Leidi. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 2010;50:3-15.

JANSEN, Ana Maria & AndreLuiz Rodrigues ROQUE. Domestic and wild mammalian reservoirs. J Telleria, M Tibayrenc, *American trypanosomiasis, Chagas disease: one hundred years of RESEARCH*, Elsevier, Burlington. 2010:249-76.

JANSEN, Ana Maria *et al.* The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta tropica*. 2015.

JARAMILLO N *et al.* The role of *Rhodnius pallescens* as a vector of Chagas disease in Colombia and Panama. *Research and Reviews in Parasitology*. 2000;60(3/4):75-82.

KALIL-FILHO, Roberto. Globalization of Chagas Disease Burden and New Treatment Perspectives. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;66(10):1190-2.

KRAUSE, William J & Winifred A KRAUSE. *The opossum: Its amazing story*: William Krause; 2006.

LEE, Bruce Y *et al.* Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet infectious diseases*. 2013;13(4):342-8.

LEMOS, Bernardo & Rui CERQUEIRA. Morphological differentiation in the white-eared opossum group (*Didelphidae: Didelphis*). *Journal of Mammalogy*. 2002;83(2):354-69.

LENT, Herman & Pedro WYGODZINSKY. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Revisión de los triatominae (Hemiptera, Reduviidae) y su significado como vectores del mal de Chagas*. *Bull Am Mus Nat Hist*. 1979;163:123-520.

LIMA, Marli M *et al.* Investigation of Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: epidemiologic survey in man, vectors, non-human hosts and reservoirs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;106(3):143-9.

MACEDO, Andréa M *et al.* *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2004;99(1):1-12.

MACKENSTEDT, Ute, David JENKINS & Thomas ROMIG. The role of wildlife in the transmission of parasitic zoonoses in peri-urban and urban areas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2015;4(67):71-9.

MANTILLA, Julio C, *et al.* Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. *Human Pathology*. 2010;41(4):610-3.

MANUEL Abba A, SUPERINA M. The 2009/2010 Armadillo red list assessment. *Edentata*. 2010;11(2):135-84.

MARTÍNEZ-CALVILLO, Santiago *et al.* Gene expression in trypanosomatid parasite . *BioMed Research International*. 2010;2010.

MEJÍA-JARAMILLO, Ana María, *et al.* Genotyping of *Trypanosoma cruzi* in a hyper-endemic area of Colombia reveals an overlap among domestic and sylvatic cycles of Chagas disease. *Parasit Vectors*. 2014;7:108.

MILES Michael A. Chagas Disease, The Agent. En Gilles H, *Protozoal Diseases*. Editorial Arnold. New York, USA. 1999. 313-322.

MILES, Michael A, Matthew YEO & Michael GAUNT. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* and the epidemiology of Chagas disease. *Molecular Pathogenesis of Chagas' Disease*, Landes Bioscience, Austin. 2003:1-15.

MILLER S, Dykes D, POLESKY H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;16(3):1215.

MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Guía de Vigilancia Entomológica y Control de Chagas. 2010.

MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Guía para la atención clínica integral del paciente con enfermedad de Chagas. 2010.

MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Protocolo para la Vigilancia en Salud Pública de Chagas.2010.

MONTEIRO, Wuelton Marcelo *et al.* *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS One*. 2012;7(7):e41284.

MOSCATELLI, Guillermo *et al.* Urban Chagas disease in children and women in primary care centres in Buenos Aires, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(5):644-8.

MOSCATELLI, Guillermo *et al.* Impact of migration on the occurrence of new cases of Chagas disease in Buenos Aires city, Argentina. *The Journal of Infection in Developing Countries.* 2013;7(08):635-7

MOSER, David R *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology.* 1989;27(7):1477-82.

MUÑOZ C *et al.* Caracterización de las Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* según sus marcadores moleculares. *Ibero-Latinoamericana de Parasitología.*5.

MUÑOZ-CALDERÓN A *et al.* Oral transmission of Chagas disease: typing of *Trypanosoma cruzi* from five outbreaks occurred in Venezuela shows multiclonal and common infections in patients, vectors and reservoirs. *Infection, Genetics and Evolution.* 2013;17:113-22.

NOIREAU, François *et al.* Some considerations about the ecology of Triatominae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 2005;77(3):431-6.

NOIREAU, François, Patricio DIOSQUE & Ana Maria JANSEN. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research.* 2009;40(2):1-23.

PATTERSON, James S *et al.* On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: Evolution, ecology and epidemiological significance. *Acta tropica,* 2009;110(2), 187-199.

PEREZ, Catherine J, Alan J LYMBERY & RC THOMPSON. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? *Trends in parasitology.* 2014;30(4):176-82.

PÉREZ-MOLINA, Jose A *et al.* Old and new challenges in Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases.* 2015.

PINAZO, Maria-Jesus; GASCON, Joaquim. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta tropica.* 2015;151:16-20.

RAMIREZ-SIERRA, Maria Jesus *et al.* Patterns of house infestation dynamics by non-domiciliated *Triatoma dimidiata* reveal a spatial gradient of infestation in rural villages and potential insect manipulation by *Trypanosoma cruzi*. *Tropical Medicine & International Health.* 2010;15(1):77-86

RASSI Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *The Lancet.* 2010;375(9723):1388-402.

RENDÓN, Lina María *et al.* New scenarios of *Trypanosoma cruzi* transmission in the Orinoco region of Colombia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2015(AHEAD):00-.

REQUENA-MÉNDEZ, Ana *et al.* Health policies to control chagas disease transmission in European countries. 2014.

REVOLLO, Susana *et al.* *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. Experimental Parasitology. 1998;89(1):30-9.

RIBEIRO Jr, Gilmar *et al.* Frequent House Invasion of *Trypanosoma cruzi*-Infected Triatomines in a Suburban Area of Brazil. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2015;9(4)

ROQUE, André Luiz R *et al.* *Trypanosoma cruzi* among wild and domestic mammals in different areas of the Abaetetuba municipality (Pará State, Brazil), an endemic Chagas disease transmission area. Veterinary Parasitology. 2013;193(1):71-7.

RUEDA, Karina *et al.* Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. Biomédica. 2014;34(4):631-41.

RUEDA, Martha Cristina *et al.* Aproximación a la biología de la zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*). Boletín Científico Centro de Museos Museo de Historia Natural. 2013;17(2):141-53.

SALDAÑA, Azael *et al.* A new endemic focus of Chagas disease in the northern region of Veraguas Province, Western Half Panama, Central America. PloS One. 2012;7(4):e34657.

SANGENIS, Luiz HC *et al.* Autochthonous transmission of Chagas disease in Rio de Janeiro State, Brazil: a clinical and eco-epidemiological study. BMC Infectious Diseases. 2015(1):4.

SCHAUB, Günter A. Chapter 4 Interactions of Trypanosomatids and Triatomines. In: Stephen JS, Jeacuterocircme C, editors. Advances in Insect Physiology. Volume 37: Academic Press; 2009. p. 177-242.

SCHMUNIS GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta tropica. 2010;115(1):14-21.

SCHOFIELD, Christopher J & Jean Pierre DUJARDIN. Chagas disease vector control in Central America. *Parasitology Today*. 1997;13(4):141-4.

SOTO, Hugo *et al.* investigación de vectores y reservorios en brote de Chagas agudo por posible transmisión oral en Aguachica, Cesar, Colombia Investigation of vectors and reservoirs in an acute Chagas outbreak due to possible oral transmission. *Cad Saúde Pública*. 2014;30(4):746-56.

SOUTO, Ricardo P *et al.* DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1996;83(2):141-52.

STEVENS, Lori *et al.* Chapter 8 - Kissing Bugs. The Vectors of Chagas. In: Louis M. Weiss HBT, Louis VK, editors. *Advances in Parasitology*. Volume 75: Academic Press; 2011. p. 169-92.

TANURI, Amilcar *et al.* A Simple, Highly Efficient Plating Method for Trypanosomatids. *The Journal of Protozoology*. 1981; 28(3):360-2.

TEIXEIRA, Santuza M *et al.* Chapter 10 - The Genome and Its Implications. In: Louis M. Weiss HBT, Louis VK, editors. *Advances in Parasitology*. Volume 75: Academic Press; 2011. p. 209-30.

TENÓRIO M *et al.* Molecular identification of Trypanosomatids in wild animals. *Veterinary Parasitology*. 2014;203(1):203-6.

TIBAYRENC, Michel *et al.* Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986;83(1):115-9.

TIBAYRENC Michel. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International Journal for Parasitology*. 1998;28(1):85-104.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*. 2001;31(5):472-81.

VÁSQUEZ, Carmen, *et al.* Identificación de nuevos escenarios epidemiológicos para la enfermedad de Chagas en la región momposina, norte de Colombia. *Biomédica*. 2013;33(4):526-37.

VASQUEZ, Ana Maria de *et al.* Eco-epidemiological aspects of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma Rangeli* and their vector (*Rhodnius pallescens*) in Panama. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2004;46(4):217-22.

VEGA Teodolinda. Informe del evento enfermedad de Chagas, hasta el periodo epidemiológico octavo, Colombia 2015.

VEGA Teodolinda. Informe final del evento enfermedad de Chagas, Colombia 2014. Instituto Nacional de Salud SIVIGILA

VIRREIRA, Myrna *et al.* Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2003;68(5):574-82.

WALECKX, Etienne, Sébastien GOURBIÈRE & Eric DUMONTEIL. Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2015 ;110(3): 324-338.

WENDEL, Silvano. Transfusion-transmitted Chagas' disease. Current Opinion in Hematology. 1998;5(6):406-11.

WESTENBERGER, Scott J *et al.* Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Genetics. 2005;171(2):527-43.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. [citado el 12 de jun de 2015]. Disponible desde: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. [citado el 12 de jun de 2015]. Disponible desde: http://www.who.int/water_sanitation_health/resources/vector210to222.pdf

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease: second report of the WHO Expert Committee. 2002

ZAFRA German *et al.* Evidence of *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombian chagasic patients. Parasitology research. 2008;103(3):731-4.

ZELEDÓN, Rodrigo *et al.* Distribution and ecological aspects of *Rhodnius pallescens* in Costa Rica and Nicaragua and their epidemiological implications. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2006;101(1):75-9.

ZINGALES, Bianca *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009;104(7):1051-4.

ZINGALES, Bianca *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infection, Genetics and Evolution. 2012;12(2):240-53.