



**CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Trypanosoma cruzi*  
(DTUs) Y SU ASOCIACIÓN CON LOS CICLOS DE TRANSMISIÓN EN LA MESA  
(CUNDINAMARCA)**

**Autores: Lina María Herrera Caicedo  
Jeimy Paola Leño Jiménez**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C  
2018**



**CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Trypanosoma cruzi*  
(DTUs) Y SU ASOCIACIÓN CON LOS CICLOS DE TRANSMISIÓN EN LA MESA  
(CUNDINAMARCA)**

**Autores: Lina María Herrera Caicedo  
Jeimy Paola Leño Jiménez**

**Asesores: Orlando Alfredo Torres García  
D.M.V., M.Sc., Ph.D  
Sandra Patricia Garzón Jiménez  
D.M.V., Esp. Epidemiología**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO  
TRABAJO DE GRADO  
BOGOTÁ D.C  
2018**

## DEDICATORIA

A mi Abuela, por ser padre, madre y guía de este camino, porque tú esfuerzo y cariño son los detonantes de la construcción de mis metas y la realización de mis sueños.

A mi Tía, que por su amor, trabajo y sacrificio de todos estos años, forjo mi carácter y me permitió la formulación y realización de mis metas propuestas.

A mi Madre por ser compañía, guía y apoyo de este camino, que me enseñó a no desfallecer ante las adversidades.

A Jeimy por ser hermana, amiga y el mejor apoyo, por el primero de muchos proyectos juntas, por la comprensión, cariño y amor completamente sincero obsequiados.

A Joan por cada momento de apoyo incondicional, por ser mi bastón, aliento para no desfallecer y la ayuda fundamental para el cumplimiento de mis metas.

Que sean muchos más los caminos recorridos junto a ustedes.

*Lina María Herrera Caicedo*

A mis abuelos Noé e Isabel por cuidarme como una hija más, y por el amor que me dan en cada abrazo. En especial a ti abuelo Noé, gracias por mostrarme el camino de esta profesión.

A mi madre, por su fortaleza ante las adversidades, su amor, esfuerzo y dedicación para hacer de mí una mujer con valores y principios, eres mi ejemplo a seguir. A mi padre, por su cariño, apoyo ante cada obstáculo y por hacerme ver el lado positivo de las cosas. Gracias a los dos por fomentar el amor familiar en todos estos años y hacerme feliz cada día con su presencia.

A mi sobrina Isabella y mi ahijada Gabriela, quienes con sus sonrisas me llenan de paz y felicidad. Ellas siguen el camino de los más grandes y en un futuro empezarán a construir el suyo.

A Lina, por enseñarme el valor de la amistad y ser parte de mi vida, como un miembro más de mi familia. Por su cariño, amor, escucha y consejos; gracias por tantos momentos vividos, las risas, el apoyo incondicional y tu confianza. Este es tan solo el comienzo.

A Carol, mi amiga y gemela, gracias por siempre estar presente en todos estos años, por llenarme de tranquilidad cada vez que lo necesitaba y recordarme quien soy.

*Jeimy Paola Leaña Jiménez*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por acompañarnos en nuestro desarrollo universitario, por darnos fuerzas para superar todos los obstáculos y complicaciones presentados en el camino, mostrándonos siempre la mejor solución y protegiéndonos con su bendición.

A nuestras familias, ya que, sin su guía, apoyo y comprensión, en momentos difíciles no hubiese sido posible la finalización de este proyecto.

Al profesor Orlando Alfredo Torres García, quién nos permitió hacer parte de este proyecto, por su confianza, sabiduría, comprensión y su vocación; a la profesora Sandra Patricia Garzón Jiménez por su paciencia, tiempo, dedicación, compromiso y aportes en este trabajo; a la doctora Yuly Elien Bernal Rosas por su apoyo, por cada enseñanza y dirección en la ejecución de técnicas de laboratorio, y ante todo a cada uno de ellos por apoyarnos en cada paso del trabajo, para que fuera posible la culminación de este proyecto. Gracias por su calidad humana y profesional.

A la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Antonio Nariño que nos permitió hacer uso de sus instalaciones y laboratorios para el desarrollo de la investigación y culminación de este proyecto.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por ser nuestra alma mater y por la formación profesional e integral recibida.

A todas las personas que de una u otra manera nos apoyaron y guiaron para alcanzar las metas que habíamos establecido.

***“El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad”***

***-V́ctor Marie Hugo***

## **FINANCIACIÓN**

Este proyecto hace parte del macro proyecto “Dinámica de la transmisión de *Trypanosoma cruzi*, en zonas urbanas, periurbanas y rurales en la región Andina – modelo municipio de La Mesa Cundinamarca”. El marco del proyecto fue financiado por Colciencias y la Universidad Antonio Nariño, con el apoyo de la Red Chagas Colombia. Entre las entidades asociadas que hicieron posible este proyecto, se encuentran la alcaldía del municipio de La Mesa (Cundinamarca) y el Instituto Nacional de Salud de Colombia; desarrollado bajo la representación del Dr. Orlando Alfredo Torres García D.M.V., M.Sc., Ph.D.

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	5
3.1. Objetivo General .....	5
3.2. Objetivos Específicos.....	5
4. ANTECEDENTES .....	6
5. MARCO TEÓRICO.....	11
5.1. Generalidades de la tripanosomiasis.....	11
5.2. Epidemiología .....	11
5.2.1. Morbilidad y mortalidad.....	12
5.2.2. Datos mundiales.....	13
5.2.3. Datos nacionales.....	13
5.2.3.1. Características geográficas .....	14
5.2.4. Datos locales .....	15
5.3. Agente.....	16
5.3.1. Taxonomía .....	17
5.3.2. Características morfológicas .....	18
5.3.2.1. Formas celulares .....	18
5.3.3. Material genético .....	19
5.3.3.1. Regulación de la expresión génica .....	21
5.3.3.2. ADN del cinetoplasto.....	21
5.3.4. Ciclo de transmisión .....	22
5.3.4.1. Ciclo doméstico .....	24
5.3.4.2. Ciclo peridoméstico.....	25
5.3.4.3. Ciclo silvestre.....	25
5.3.5. Clasificación del agente .....	26
5.3.5.1. Biodemas.....	26
5.3.5.2. Zimodemas .....	27
5.3.5.3. Esquizodemas.....	27
5.3.5.4. Unidades Discretas de Tipificación (DTUs).....	27
5.4. Vector.....	31
5.4.1. Características morfológicas .....	32
5.4.2. Ciclo reproductivo.....	33
5.5. Huéspedes.....	33
5.5.1. Zarigüeya común ( <i>Didelphis marsupialis</i> ) .....	34
5.5.1.1. Fisiopatología.....	36
5.5.2. Perro ( <i>Canis lupus familiaris</i> ).....	36
5.5.2.1. Periodo de incubación.....	37
5.5.2.2. Fisiopatología.....	37

5.5.2.2.1. Forma aguda .....	37
5.5.2.2.2. Fase indeterminada o latente .....	38
5.5.2.2.3. Fase crónica.....	38
5.5.3. Humano.....	38
5.5.3.1. Periodo de incubación.....	38
5.5.3.2. Fisiopatología.....	39
5.5.3.2.1. Aspectos inmunológicos .....	39
5.5.3.2.2. Fases clínicas .....	41
5.5.3.2.2.1. Fase aguda.....	41
5.5.3.2.2.2. Fase latente o indeterminada .....	41
5.5.3.2.2.3. Fase crónica .....	42
5.5.3.2.2.4. Forma congénita.....	43
5.6. Puerta de entrada.....	43
5.6.1. Chagoma.....	43
5.6.2. Signo de Romana .....	43
5.6.3. Otros.....	44
5.7. Mecanismos de transmisión .....	44
5.7.1. Transmisión Vectorial.....	44
5.7.2. Transmisión oral .....	44
5.7.3. Transmisión transfusional.....	46
5.7.4. Transmisión transplacentaria .....	46
5.7.5. Transmisión por trasplante .....	46
5.7.6. Transmisión por lactancia materna .....	46
5.7.7. Transmisión sexual.....	46
5.8. Factores de riesgo y determinantes de la salud .....	47
5.9. Diagnóstico .....	48
5.9.1. Pruebas parasitológicas directas .....	49
5.9.1.1. Examen en fresco .....	49
5.9.1.2. Extendido coloreado .....	49
5.9.1.3. Biopsia.....	49
5.9.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	50
5.9.2. Pruebas parasitológicas indirectas .....	51
5.9.2.1. Xenodiagnóstico .....	51
5.9.2.2. Cultivo.....	52
5.9.2.3. Inoculaciones en animales.....	52
5.9.3. Pruebas serológicas .....	53
5.9.3.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI) .....	53
5.9.3.2. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	54
5.9.3.3. Hemaglutinación indirecta (HAI).....	54
5.9.3.4. Métodos de transferencia a filtros.....	54

5.10.	Tratamiento .....	55
5.11.	Prevención .....	55
6.	HIPÓTESIS .....	58
7.	METODOLOGÍA .....	58
7.1.	Enfoque metodológico, tipo y diseño de la investigación .....	58
7.2.	Población.....	58
7.3.	Diseño muestral .....	58
7.3.1.	Captura de triatominos .....	59
7.3.2.	Captura de zangüeyas .....	60
7.4.	Criterios de inclusión y exclusión .....	61
7.5.	Descripción de variables.....	61
7.5.1.	Variable dependiente .....	61
7.5.2.	Variable independiente .....	61
7.6.	Técnicas de procesamiento y análisis de datos .....	61
7.6.1.	Cuantificación de ADN.....	61
7.6.2.	PCR.....	61
7.6.2.1.	PCR con los cebadores LCO 1940 – HCO 2198.....	61
7.6.2.2.	PCR con los cebadores S35 y S36 .....	62
7.6.2.3.	PCR con los cebadores TCI, TCII y TCC .....	63
7.6.3.	Hemaglutinación indirecta (HAI) .....	63
7.6.4.	Análisis estadísticos .....	63
7.7.	Consideraciones éticas .....	64
7.8.	Consentimiento de información .....	64
8.	RESULTADOS.....	65
9.	DISCUSION .....	80
10.	CONCLUSIONES .....	89
11.	RECOMENDACIONES .....	91
12.	REFERENCIAS.....	114

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>T. cruzi</i> sus ecótopos, huéspedes, vectores y asociaciones con la enfermedad de Chagas. Fuente: Elaboración propia. ....	<b>30</b>
<b>Tabla 2.</b> Utilidad de las pruebas de diagnóstico en las formas clínicas .....	<b>48</b>
<b>Tabla 3.</b> Número y porcentaje de humanos clasificados según el sexo, la zona y los métodos diagnósticos.....	<b>74</b>
<b>Tabla 4.</b> Número y porcentaje de caninos clasificados según el sexo, la zona y los métodos diagnósticos.....	<b>75</b>
<b>Tabla 5.</b> Número y porcentaje de triatominos clasificados según la especie, estadio, la zona, el ambiente y los métodos diagnósticos .....	<b>76</b>
<b>Tabla 6.</b> Sensibilidad de las técnicas diagnósticos utilizadas para las muestras de triatominos. Fuente:.....	<b>76</b>
<b>Tabla 7.</b> Número y porcentaje de los DTUs presentes en los triatominos positivos para PCR. Fuente: .....	<b>76</b>
<b>Tabla 8.</b> Número y porcentaje de zarigüeyas clasificadas según la especie, sexo, condición corporal, la zona y los métodos diagnósticos. Fuente: Elaboración propia...	<b>77</b>
<b>Tabla 9.</b> Razón de productos cruzados de la no ocurrencia (0) y ocurrencia (1) de Conducta de Riesgo (CR), Riesgo Alimentario (RA) y Vivienda Precaria (VP) en zonas con presencia (SI) o ausencia (NO) de humanos, caninos, triatominos y zarigüeyas positivas. P: Porcentaje. Fuente:.....	<b>79</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de triatominos en Colombia y Cundinamarca. Fuente: Elaboración propia. ....	15
<b>Figura 2.</b> Distribución de triatominos en La Mesa, Cundinamarca, Colombia. ....	16
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática del ciclo de vida del Protozoario flagelado <i>T. cruzi</i> . ....	17
<b>Figura 4.</b> Formas celulares de <i>T. cruzi</i> .....	18
<b>Figura 5.</b> Red de ADN del kinetoplasto de <i>T. cruzi</i> . ....	22
<b>Figura 6.</b> Posibles modalidades y relaciones entre los ciclos de transmisión de <i>T. cruzi</i> . ....	24
<b>Figura 7.</b> Distribución geográfica aproximada de las DTU de <i>T. cruzi</i> en ciclos de transmisión domésticos y selváticos. ....	29
<b>Figura 8.</b> Esquema de evolución de los DTUs de <i>T. cruzi</i> . ....	30
<b>Figura 9.</b> Ciclo de vida del vector. ....	33
<b>Figura 10.</b> Distribución geográfica de <i>Didelphis</i> en Colombia. ....	36
<b>Figura 11.</b> Evasión de la respuesta inmune por <i>T. cruzi</i> en las diferentes fases de la enfermedad. Fuente:Elaboración propia, m .....	39
<b>Figura 12.</b> Vías de contagio de la enfermedad de Chagas por vía oral. ....	45
<b>Figura 13.</b> Dianas de diagnóstico y caracterización molecular de <i>T. cruzi</i> . ....	51
<b>Figura 14.</b> Secuencias conservadas de S35-S36. ....	62
<b>Figura 16.</b> Diagrama del locus del gen minixon de <i>T. cruzi</i> . ....	63
<b>Figura 17.</b> Barrios y veredas muestreados. Fuente: Elaboración propia. ....	65
<b>Figura 18.</b> Barrios y veredas muestreados para humanos con resultados positivos ....	66
<b>Figura 19.</b> Barrios y veredas muestreados para caninos con resultados positivos .....	67
<b>Figura 20.</b> Captura de triatominos .....	68
<b>Figura 21.</b> Dos ejemplares de triatominos capturados .....	68
<b>Figura 22.</b> Barrios y veredas muestreados para triatominos con resultados positivos .	69
<b>Figura 23.</b> Captura de zarigüeyas .....	70
<b>Figura 24.</b> Inspección de las características fisiológicas y corporales. ....	70
<b>Figura 25.</b> Barrios y veredas muestreados para triatominos con resultados positivos .	71

<b>Figura 26.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación del ADN de triatominos con el gen Housekeeping (LCO-HCO) .....	<b>72</b>
<b>Figura 27.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación del ADN de triatominos con el protocolo de ADN del kinetoplasto (S35-S36) .....	<b>72</b>
<b>Figura 28.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación del ADN de triatominos con el gen del miniexón (TCI-TCII-TCIII).....	<b>73</b>
<b>Figura 29.</b> Hemaglutinación Indirecta (HAI) en muestras de zarigüeyas.....	<b>74</b>
<b>Figura 30.</b> Muestreo de zarigüeyas en La Mesa (Cundinamarca).....	<b>78</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1. Extracción del ámpula rectal en triatominos vivos .....</b>	<b>93</b>
<b>Extracción del ámpula rectal en triatominos muertos .....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO 2. Protocolo de extracción ADN sangre total por fenol cloroformo.....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO 3. Protocolo extracción ADN insectos fenol cloroformo .....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO 4. Limpieza ADN insectos por lana de vidrio .....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO 5. Protocolo de limpieza y purificación para ADN mediante la utilización de Kit Purelink™ viral RNA/DNA kit.....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO 6. Protocolo de amplificación de PCR para cebadores LCO – HCO .....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO 7. Protocolo de amplificación de PCR para cebadores S35 y S36 .....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO 8. Protocolo de amplificación de PCR para cebadores TCI – TCII – TCIII .....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO 9. Protocolo para electroforesis en gel de agarosa.....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO 10. Hemaglutinación indirecta (HAI) .....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO 11. Boletín de la mesa Cundinamarca sobre la enfermedad de Chagas</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO 12. Encuesta de humanos.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO 13. Ciclo intracelular del parásito .....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXO 14. Ciclo del parásito dentro del triatomo .....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO 15. Muestreo de humanos, caninos y triatominos.....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO 16. Diseño de formulario Epi Info 7.0.....</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO 17. Tabla de frecuencia de las encuestas analizadas frente a los factores de riesgo. ....</b>	<b>113</b>

## RESUMEN

**Introducción:** La enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, afecta entre 10 a 18 millones de personas en Latinoamérica y 25 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad; se clasifica hoy como una enfermedad olvidada y desatendida en Colombia y países de América del sur. El municipio de La Mesa (Cundinamarca) se encuentra clasificado como un escenario de alto riesgo para la adquisición de la enfermedad.

*T. cruzi* ha sido clasificado en seis unidades discretas de tipificación (DTUs) desde TcI a TcVI, distribuidas en diversas especies de vectores y reservorios, llevándolos a predominar entre los ciclos doméstico, peridoméstico y silvestre. De esta manera, se ha encontrado que TcI, TcIII y TcIV circulan en el ciclo silvestre; mientras que, en el ciclo doméstico, prevalece TcII, TcV y TcVI. Dentro de ellas, las cepas con mayor importancia son: TcI que contiene características más virulentas y TcII que causa formas digestivas de la infección con presencia en Colombia.

**Materiales y métodos:** A partir de muestras de humanos, caninos, triatomíneos y zangüeyas, se confirma la presencia de *T. cruzi* y se realiza un algoritmo diagnóstico para la identificación de los DTUs circulantes, usando el método convencional de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**Resultados:** Se obtuvo un porcentaje de positividad para la presencia de *T. cruzi* de 1,97% para humanos, 35,9% para caninos, 58,7% para triatomíneos y 59,3% para zangüeyas con clones pertenecientes de DTU I y otros DTUs.

**Palabras Clave:** Enfermedad de Chagas, *Didelphis marsupialis*, caninos, triatomíneos, humanos, DTUs.

## ABSTRACT

**Introduction:** Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects 10 to 18 million people in Latin America and 25 million people are at risk of getting the disease; It is classified today as a forgotten and neglected disease in Colombia and South American countries. The municipality of La Mesa (Cundinamarca) is classified as a high-risk scenario for the acquisition of the disease.

*T. cruzi* has been classified into six discrete classification units (DTUs) from TcI to TcVI, distributed in various species of vectors and reservoirs, leading them to predominate between domestic, peridomestic and wild cycles. Thus, it has been found that TcI, TcIII and TcIV circulate in the wild cycle; While in the domestic cycle, prevails TcII, TcV and TcVI. Among them, the most important strains are: TcI which contains more virulent and TcII characteristics that cause digestive forms of infection.

**Materials and methods:** From samples of humans, canines, triatomine and opossums, it confirms the presence of *T. cruzi* and performs a diagnostic algorithm for the identification of circulating DTUs, using the conventional method of polymerase chain reaction (PCR).

**Results:** Was obtained and percentage of positivity for the presence of *T. cruzi* of 1.97% for humans, 35.9% for canines, 52.9% for triatomine and 59.3% for opossums with clones belonging to DTU I and other DTUs.

**Key words:** Chagas disease, *Didelphis marsupialis*, canines, triatomine, human, DTUs.

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una antropozoonosis de transmisión vectorial causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, el cual utiliza un ciclo complejo compuesto por un amplio rango de reservorios y vectores implicados en su supervivencia <sup>(1)</sup>. Esta afecta entre 10 a 18 millones de personas en Latinoamérica y 25 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad, clasificándose hoy como una enfermedad olvidada y desatendida en Colombia y en países de América del sur <sup>(2) (3) (4)</sup>.

Es importante reconocer que esta enfermedad es originalmente una infección de mamíferos salvajes del continente americano, con focos aparentemente múltiples, que por acciones antrópicas se convirtió en un problema de salud pública cuando los insectos vectores de la familia *Reduviidae* se adaptaron a las viviendas humanas <sup>(5), (6)</sup> aumentando el riesgo de adquisición de la enfermedad y renovando las áreas endémicas con la aparición en zonas nuevas donde no había presencia del parásito debido a que se mantienen las condiciones ecológicas y demográficas proclives a su desarrollo <sup>(7), (8)</sup>.

La región de La Mesa (Cundinamarca) es un escenario de alto riesgo de adquisición de la enfermedad, ya que cuenta con las características geográficas necesarias para el desarrollo del vector y su población se desempeña en un ambiente mayoritariamente rural que introduce al humano como parte activa de la cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas <sup>(9), (10)</sup>.

La importancia del ecosistema en este fenómeno antropozoonótico de la enfermedad de Chagas, radica en observar el sistema “vector-reservorio” como un mantenedor de las poblaciones de clones de *T. cruzi* dentro del ambiente <sup>(11)</sup>. Puesto que los actores de un ciclo en donde actúan tanto el vector como el hospedero se encuentran dentro de un determinado ambiente y en conjunto forman una unidad biológica, un sistema único y dinámico que genera cambios en función de las alteraciones del medio ambiente y la variación de la abundancia de ellos <sup>(12)</sup>.

Sin embargo, a la fecha no se han realizado estudios serológicos en la región de La Mesa (Cundinamarca), por tanto, no se conoce el verdadero estado de la transmisión de *T. cruzi*, en esta región. No obstante, a pesar de la existencia de métodos moleculares que permiten caracterizar y conocer la dinámica de transmisión del parásito mediante el análisis de su variabilidad genética, no se han realizado estudios que abarquen todo el circuito epidemiológico de la enfermedad en una zona geográfica y por lo tanto no se ha establecido relación entre la variabilidad genética del parásito y la dinámica de transmisión de la enfermedad en los diferentes ciclos epidemiológicos <sup>(9)</sup>.

Razón por la cual se realizó un estudio con muestras de humanos, perros (*Canis lupus familiaris*), triatominos, zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*), y la recolección de encuestas, con el fin de asociar mediante técnicas moleculares, el posible ciclo de transmisión de *T. cruzi*, que afecta a la población del municipio La Mesa (Cundinamarca) con las Unidades Discretas de Tipificación (DTUs) de cada muestra recolectada y la asociación entre los desenlaces y los factores de riesgo hallados a través de las encuestas.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas causada por el protozoo *T. cruzi* es considerada una enfermedad desatendida en países de América Latina y América Central, debido a que su presencia es de fase crónica en la población; por esta razón las diferentes políticas gubernamentales han dejado de lado su vigilancia y diagnóstico, lo que conlleva a falencias en la calidad y cobertura tanto en la fase etiológica como en la cardiopática <sup>(39)</sup>.

La importancia de la parasitosis radica en su elevada prevalencia, incurabilidad, grandes pérdidas económicas por incapacidad laboral, y muerte repentina de personas aparentemente sanas <sup>(13)</sup>. Hoy día, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen 10 a 18 millones de personas infectadas con *T. cruzi*; a pesar de conocer diferentes formas de transmisión (por consumo de alimentos contaminados por *T. cruzi*, contacto con heces u orina de triatomíneos o marsupiales, transfusión de sangre infectada, transmisión de la madre infectada a su hijo durante el embarazo o el parto, el trasplante de órganos provenientes de una persona infectada y por accidentes de laboratorio), su control y prevención se ha enfocado en el vector, mejora de higiene alimentaria y limpieza de viviendas, lo que deja de lado al estudio de la ecología de la enfermedad <sup>(2), (14), (15)</sup>.

Debido a que la mayoría de los casos agudos tiene un curso leve o asintomático, caracterizado por la presencia de síntomas muchos años después de la infección, es comprensible que, en algunos países, la enfermedad sea subestimada y desatendida como un problema de salud pública <sup>(5)</sup>.

Pocos son los estudios de las características de los nichos ecológicos de las diferentes especies de reservorios y de insectos triatomíneos; tampoco se conoce su comportamiento con relación a la población humana, cuáles son las características de las poblaciones de *T. cruzi* que circulan en los diferentes eslabones de la cadena de transmisión y cuáles son sus implicaciones epidemiológicas y patogénicas <sup>(16)</sup>. La evaluación por separado de los ciclos no ha permitido entender la distribución de clones dentro de éstos, pues en la naturaleza no se encuentran separados. Por este motivo, es necesario analizar la ecología de las enfermedades zoonóticas para que de esta manera se comprenda la dinámica de transmisión y se amplíen estudios sobre los clones circulantes <sup>(11)</sup>.

La vigilancia epidemiológica de *T. cruzi* es compleja ya que los estudios del ciclo de la enfermedad de Chagas no han sido suficientes, debido a que se debe considerar cada eslabón de la cadena de transmisión y el ambiente en el que ocurre. Actualmente se realizan sólo actividades enfocadas en la recolecta de triatomíneos y el monitoreo de nuevos casos de la enfermedad de Chagas en humanos, dejando de lado aquellos mamíferos y roedores que interfieren en la interacción del parásito <sup>(11)</sup>.

El país se caracteriza por la falta de información precisa y oportuna en cuanto a la frecuencia y distribución de los triatomíneos transmisores. El control integral de la enfermedad de Chagas es uno de los objetivos planteados en el Plan Decenal de Salud Pública 2012 a 2021 <sup>(17)</sup>.

Este trabajo desarrolla un modelo de identificación molecular de *T. cruzi*, caracterización de los DTUs circulantes y el análisis con su posible asociación a factores de riesgo de la población del municipio de La Mesa (Cundinamarca), que conllevan a la adquisición de cierto tipo de clon del parásito; lo que promueve el desarrollo del comportamiento doméstico, peridoméstico y silvestre a partir de vectores y reservorios presentes en el municipio.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

Caracterizar a *T. cruzi* mediante la determinación de las Unidades Discretas de Tipificación (DTUs) asociándolo a los ciclos de transmisión, a partir de muestras de humanos, caninos, zarigüeyas y triatominos tomadas en el periodo comprendido entre junio de 2015 a noviembre de 2017 en el municipio de La Mesa (Cundinamarca – Colombia).

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Confirmar la presencia de *T. cruzi* en muestras sanguíneas positivas para técnicas serológicas (ELISA e IFI) de humanos y caninos mediante técnicas moleculares.
- Identificar la presencia de *T. cruzi* en muestras fecales de triatominos y muestras sanguíneas de zarigüeyas mediante técnicas moleculares.
- Caracterizar las Unidades Discretas de Tipificación (DTUs) en muestras de humanos, caninos, triatominos y zarigüeyas con presencia de ADN de *T. cruzi* procedentes del municipio de La Mesa (Cundinamarca – Colombia).
- Analizar la posible asociación entre reservorios, distribución geográfica y DTUs de *T. cruzi* circulantes en el municipio de La Mesa (Cundinamarca – Colombia).

#### 4. ANTECEDENTES

La Tripanosomiasis americana fue descubierta por el médico infectólogo brasileño Carlos Riveiro Justiniano Chagas, en 1909 quien caracterizó por primera vez el agente, su ciclo de transmisión (Vector – Huésped) y las manifestaciones clínicas agudas en Brasil <sup>(18)</sup>, <sup>(19)</sup>; sin embargo, ya existían estudios paleoparasitológicos que demostraban la presencia de *Trypanosoma cruzi* en momias 4.000 años a.C. <sup>(20)</sup>. Lo que Chagas descubrió no fue una dolencia de poca importancia, sino la mayor afección oculta de las Américas <sup>(21), (22), (23)</sup>.

En una campaña antimalárica en el estado de Minas Gerais, Chagas fue informado de la presencia de abundantes insectos hematófagos que habitaban en las chozas y que picaban a los moradores de noche; luego de analizarlos, encontró en las heces de los triatominos: flagelados con características morfológicas diferentes a *Trypanosoma minasense* o a otro parásito conocido, indudablemente se trataba de una nueva especie cuya característica distintiva era el blefaroplasto <sup>(19), (24)</sup>; posteriormente observó cada una de las fases del microorganismo durante su complejo ciclo vital y logró cultivarlo artificialmente. Además, identificó que no solo se podía transmitir a los monos sino también a cachorros, cobayos y conejos; para estas criaturas era patógeno, pues podría causarles la muerte por septicemia <sup>(6), (21), (25)</sup> y descubrió que el armadillo (*Dasypus novemcincus*) era un reservorio natural de *T. cruzi* <sup>(12), (21)</sup>.

El 14 de abril de 1909 encontró positivo a un gato enfermo relacionándolo a una niña llamada Berenice que padecía un ataque febril intenso en una casa donde los insectos habían picado a los moradores; al realizar un examen microscópico encontró gran número de flagelados. Con esta información Chagas decidió llamar al microbio *T. cruzi* en honor al bacteriólogo y epidemiólogo brasileño Oswaldo Cruz. Debido a que no existía un signo característico de la enfermedad, fue nombrada enfermedad de Chagas <sup>(21)</sup>.

Chagas identificó un insecto hematófago conocido como *Panstrongylus megistus*, el cual poseía un comportamiento diurno caracterizado por ocultarse en los techos de paja y en las grietas de las paredes, y hábitos nocturnos por picar a la gente mientras dormía, conocido comúnmente como *barbeiro* (barbero), debido a que la picadura se daba en la cara <sup>(21)</sup>.

Los insectos triatominos son de origen selvático y la degradación de su hábitat, permite la adaptación a viviendas humanas que varía de una especie a otra. Algunas especies viven exclusivamente en contacto con los animales salvajes y rara vez tienen contacto con el hombre <sup>(5)</sup>.

En Colombia, César Uribe en 1923 encontró los mismos flagelados en deyecciones de reduvidos procedentes del departamento del Tolima. Los doctores Matíz y Ucroz, 15 años después, hicieron observaciones similares en Cundinamarca. Brumpt por la misma época encontró vectores en Boyacá, Meta y Santander. En 1941, Bonilla publicó el primer caso clínico en un niño, fecha a partir de la cual empezó la búsqueda sistemática del parásito en diferentes poblaciones <sup>(19), (23)</sup>.

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, su infección es asintomática y cuando presenta cuadros clínicos se puede clasificar en aguda o crónica, es la principal causa de miocardiopatía dilatada en el hombre <sup>(26)</sup>. Tiene grandes consecuencias en la salud y por ende repercusiones socio-económicas, que constituyen un problema de Salud Pública en Centro y Sur América <sup>(27)</sup>, relacionado con el desarrollo económico, social y acceso a la vivienda <sup>(1)</sup>. La OMS define un caso positivo para enfermedad de Chagas aquel que reúne tres criterios: antecedente de residencia en zona endémica, cuadro clínico compatible y dos pruebas serológicas por técnicas diferentes positivas para anticuerpos contra *T. cruzi* <sup>(14)</sup>.

Las enfermedades vectoriales se presentan con mayor frecuencia en zonas tropicales y subtropicales en donde las condiciones de vida son precarias <sup>(28)</sup>, la mayor prevalencia se da en las regiones rurales más pobres de América Latina <sup>(13)</sup>. En términos generales, la enfermedad de Chagas constituye la cuarta enfermedad más importante <sup>(29)</sup>, y la tercera enfermedad parasitaria tras el paludismo y la esquistosomiasis <sup>(30), (31), (32)</sup>.

El primer brote de Chagas agudo en Latinoamérica, se presentó al sur de Brasil en 1960, donde 17 personas estuvieron implicadas, cinco fallecieron; la transmisión fue atribuida a una comida contaminada de una escuela local por la ingestión de caña de azúcar <sup>(18), (33)</sup>.

La endemia ha sido reportada en Colombia desde el Siglo XX y los estudios nacionales muestran más de 15 departamentos de la zona oriental del país en riesgo de transmisión <sup>(16)</sup>. Se estima que en Colombia existen alrededor de 436.000 pacientes con enfermedad de Chagas, con una incidencia anual de 5.250 casos por transmisión vectorial y 1.000 casos por infección congénita, con cerca de cinco millones de habitantes en zonas endémicas, así mismo el costo de la enfermedad asciende a un valor anual estimado para el 2008 de alrededor de US \$272 millones que incluye atención médica y labores de fumigación <sup>(34)</sup>.

En Colombia, a pesar de la certificación de interrupción de la transmisión vectorial domiciliar en algunos municipios, se presenta la transmisión oral, por lo que es necesario

implementar medidas educativas en la comunidad para el adecuado manejo de alimentos y el conocimiento de la posible contaminación, además de extender el conocimiento a los médicos en cuanto al diagnóstico diferencial, manejo clínico y cardiológico, para evitar casos fatales <sup>(35)</sup>.

El primer caso de Chagas Agudo en Colombia, fue un brote en 1999 en Guamal (Magdalena) en donde se describieron 13 casos <sup>(16), (27)</sup>; la contaminación se dio por la ingesta de vino de palma que usualmente se consume en esta zona del país <sup>(18)</sup>. El segundo brote se informó en Tibú (Norte de Santander), donde se afectó un grupo de 14 miembros de las fuerzas militares. Un tercer brote se registró en 2003 en Bucaramanga (Santander) con 3 casos fatales; sin embargo, en ninguno de estos tres brotes investigados, se encontró puerta de entrada o fuente de exposición, llevando a presumir que la fuente común fue la transmisión por vía oral <sup>(18)</sup>.

Cundinamarca es un departamento que se caracteriza por tener municipios clasificados dentro de los rangos: alto, medio y bajo riesgo de endemidad para la enfermedad de Chagas, con una tasa de infestación (% de casas con triatomos) de 1,9%, siendo el municipio de La Mesa uno de los clasificados en alto riesgo <sup>(9), (10), (69)</sup>; sin embargo, a la fecha no existen algún reporte de casos confirmados para la presencia de *T. cruzi* en habitantes de esta región, aunque se revela la presencia de *Pastrongylus geniculatus* y *Rhodnius prolixus* como vectores activos de la transmisión para el año 2007<sup>(67)</sup>.

Las acciones antrópicas del hombre permitieron que nuevos triatomos, hábitats y hospederos para *T. cruzi* sufrieran una transformación genética y fenotípica para llegar a un total estado de domesticación o sinantropía, que permite la movilidad del ectoparásito y genera epidemias; esto transformó la enfermedad de una zoonosis a una antropozoonosis, produciendo la patología que fue descrita por Carlos Chagas en 1909 <sup>(7), (36)</sup>.

En conclusión, la modificación de ecótopos por la acción antrópica mantiene un ciclo enzoótico de *T. cruzi* y modifica el ciclo epidemiológico de la enfermedad, lo cual hace una expansión de los asentamientos humanos en espacios naturales que trae como consecuencia la disminución de los refugios y de las fuentes de alimento de los vectores y reservorios en su hábitat natural, lo que favorece la migración hacia un nuevo habitáculo. Si a esto agregamos los estímulos para su migración, como la iluminación y la agregación de viviendas con presencia de potenciales huéspedes, se pueden configurar nuevas circunstancias de transmisión <sup>(37), (38)</sup>.

La preferencia del triatomo hacia sitios recién domiciliados por humanos en ámbitos silvestres, aumenta su densidad en casas silvestres, debido a que las viviendas positivas

normalmente se encuentran en zonas periféricas. Las ninfas en habitaciones poseen un comportamiento totalmente sinantrópico sin necesidad de migración, por lo tanto, la colonización está ligada a la domiciliación, lo que genera un proceso de evolución etiológico y genético sumamente acelerado hacia la sinantropía <sup>(7)</sup>.

El ciclo de transmisión de *T. cruzi* en el ambiente aún es un rompecabezas no resuelto, puesto que presenta peculiaridades regionales, temporales, macro y microecológicas, que interfieren en la relación parásito-vector. Cada situación epidemiológica de la tripanosomiasis es única en un determinado rango de espacio y tiempo, por lo tanto, las generalizaciones en las medidas de control pueden ser ineficientes <sup>(11)</sup>.

La transmisión de *T. cruzi* en los países endémicos depende de la confluencia de vectores, reservorios, parásitos y anfitriones (personas y animales) en un solo hábitat <sup>(26)</sup>. La enfermedad de Chagas afecta varias poblaciones de Sur América y América Central, *T. cruzi* se caracteriza por circular en más de 150 especies de animales silvestres, principalmente en zarigüeyas, macacos y armadillos <sup>(12), (39), (40), (41)</sup>.

Entre los diferentes reservorios de América Central y del Sur presentes en cada uno de los ciclos encontramos a los perros que a menudo causan una elevada tasa de infección de 10,5% a 61%; estos animales sirven como centinelas de vigilancia para la transmisión al humano en el hábitat doméstico <sup>(42)</sup>, el cual corresponde al espacio nidal, y, peridoméstico como espacios fuera de lo anterior dentro de los límites de la casa que involucran animales domésticos o sinantrópicos <sup>(7)</sup>, que mantienen el ciclo bajo el nombre de anfixenosis, es decir que se transmite de los animales al hombre y viceversa, principalmente por el insecto vector <sup>(43)</sup>.

La prevalencia de la infección por *T. cruzi* en viviendas humanas es más notable debido a factores de estilo de vida como su alojamiento y la exposición a huéspedes vertebrados silvestres o la preferencia hacia ciertas razas de perros. En 2002 se encontró que 24 de 31 triatominos recogidos por debajo del patio de una residencia del sur de Texas, estaban asociados a la infección en estos caninos ya que tres perros allí murieron de la enfermedad. La importancia de los perros ha sido bien documentada en América del Sur, y parece estar influenciada por: cepa del parásito, dosis infecciosas, salud del huésped y estado nutricional <sup>(42), (44)</sup>.

Las ratas y ratones presentan diferentes tasas de infección que han sido reportadas, varían de acuerdo a su ubicación geográfica y la especie de triatolino más frecuente en la región. Animales como los murciélagos son un enigma por la dificultad de identificar tripanosomas de tipo *T. cruzi*; sin embargo, es posible que puedan ser un riesgo al encontrarse restos de heces y orina en alimentos contaminados <sup>(6)</sup>.

Los perros y gatos son importantes reservorios domésticos de *T. cruzi*, especialmente en aquellas áreas donde *T. infestans* es el principal vector de la enfermedad. Algunos de los reservorios silvestres, debido a sus hábitos, juegan un papel importante en la vinculación de los ciclos silvestres y los ciclos domésticos, en los que el hombre es una de las víctimas. Especies y subespecies de *Didelphis* son probablemente los reservorios silvestres más importantes del continente americano, ya que la zarigüeya común es un animal muy prolífico, con una gran capacidad de adaptación, es ampliamente distribuida y sus índices de infección son considerablemente altos <sup>(5), (45)</sup>.

El reconocimiento de la presencia del ciclo de *T. cruzi* en glándulas anales de zarigüeyas apoya la idea de la implicación directa de este animal sin involucrar directamente a los insectos vectores, incluso en zonas endémicas la infección por vía oral asociada a esta especie es probablemente más frecuente de lo que suele suponerse <sup>(43)</sup>. El primer caso de infección natural de *T. cruzi* en marsupiales fue reportado por Robertson (1929) en *D. marsupialis* <sup>(46)</sup>. En 1986 Deane y col. mostraron el ciclo completo de *T. cruzi* y reportaron que podrían tomar lugar en las glándulas odoríferas anales del *D. marsupialis*, lo que evita el desarrollo en el vector <sup>(43), (47) (48)</sup>.

*T. cruzi* se encuentra abundantemente como epimastigote en el lumen de las glándulas anales, transformándose en tripomastigote metacíclico imitando el ciclo existente en el intestino del vector y al mismo tiempo un ciclo intracelular con tripomastigotes en torrente sanguíneo que demuestra la parasitemia persistente <sup>(43), (49), (50)</sup>, encontrándose que 47% de 69 ejemplares capturados presentan positividad para *T. cruzi* <sup>(46)</sup>.

Comensales extradomésticos como las zarigüeyas del género *Didelphis* que son omnívoras y a menudo se presentan en las casas en busca de comida, o para anidar en sus tejados, se consolidan como otro punto importante ya que la orina de estos animales pueden contaminar el agua y los alimentos con *T. cruzi* <sup>(35), (51)</sup>, lo que puede explicar la epidemia de la enfermedad de Chagas en circunstancias donde no pudo hallarse ningún triatomino <sup>(6)</sup>.

La biodiversidad de mamíferos selváticos y triatominos, mantiene la circulación de los diferentes genotipos en el medio ambiente <sup>(33)</sup>. La existencia de focos enzoóticos tiene implicaciones de importancia ya que estos pueden permanecer no reconocidos por largos periodos de tiempo, lo que constituye zonas silenciosas del patógeno que representan una amenaza epidemiológica potencial <sup>(12)</sup>.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1. Generalidades de la tripanosomiasis

Las tripanosomiasis son antropozoonosis, producidas por parásitos flagelados transmitidos por vectores, que tienen dos localizaciones particulares: africana y americana. La tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño es producida por *Trypanosoma brucei* (*Trypanosoma gambiense* y *Trypanosoma rhodesiense*), éstos afectan el sistema nervioso central y su vector son las moscas “tsetse” del género *Glossinia* <sup>(19)</sup>. La tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas) es una zoonosis parasitaria causada por *Trypanosoma cruzi* <sup>(13)</sup> que afecta principalmente el corazón y el tubo digestivo <sup>(52)</sup>. *Trypanosoma rangeli* es el segundo más común en el hombre y aunque no se considera patógeno para éste, es importante epidemiológicamente, ya que ambos comparten vectores y reservorios y por ende se pueden presentar reacciones cruzadas <sup>(53) (54)</sup>.

La enfermedad de Chagas es el fenómeno infeccioso endémico más letal del hemisferio occidental <sup>(55)</sup> constituido como un problema de salud pública en la mayoría de países latinoamericanos <sup>(52)</sup>, muy poco prevalente en los denominados países desarrollados, en donde los casos registrados se deben a los procesos de inmigración de nuestras poblaciones <sup>(19)</sup>; sin embargo, es la tercera enfermedad parasitaria más importante en el mundo tras el paludismo y la esquistosomiasis <sup>(30), (56)</sup>. En ella participan reservorios domésticos, peridomésticos y silvestres <sup>(45)</sup>.

### 5.2. Epidemiología

Dentro de las aproximadas 80 enfermedades llamadas tropicales, la enfermedad de Chagas constituye uno de los más importantes problemas de salud pública por la carga de enfermedad que representa para nuestro país y en general para toda Latinoamérica <sup>(19)</sup>. Las consecuencias socioeconómicas a largo plazo de los estados crónicos son incalculables. Además, la distribución de los artrópodos vectores y la presencia de *T. cruzi* en animales es mucho más generalizada en las Américas que la infección humana <sup>(21), (22)</sup>.

El lento progreso de investigación en la enfermedad de Chagas está íntimamente relacionado con la pobreza, la gran desprotección de la población afectada, la limitación de recursos para investigación en el tema y el bajo interés de la industria e insuficientes esfuerzos de los entes gubernamentales y no gubernamentales reguladores de las políticas de salud a nivel nacional y transnacional <sup>(19)</sup>.

La epidemiología de la enfermedad depende de la presencia de vectores infectados y de mamíferos que sirven como reservorio y fuentes de infección <sup>(19)</sup>. *T. cruzi* tiene uno de los rangos de hospedadores mamíferos e insectos más amplios, es capaz de parasitar diferentes tejidos, por lo que es posible encontrarlo en casi todos los hábitats de América <sup>(12)</sup>.

El hecho de que la enfermedad de Chagas se da en zonas donde hay un importante solapamiento entre la fauna silvestre, el ganado, los animales domésticos y diversas actividades humanas, más el incremento de las áreas rurales poco degradadas hace que los estudios silvestres de este tipo de zoonosis sean de gran importancia para la salud pública <sup>(12)</sup>.

### 5.2.1. Morbilidad y mortalidad

Los índices de morbilidad y mortalidad varían según la etapa de la enfermedad. Aproximadamente el 5% de las personas infectadas con *T. cruzi* desarrolla síntomas agudos. Los cálculos en la tasa de letalidad para la enfermedad de Chagas aguda varían del 5% a 8% en las personas inmunológicamente competentes; las muertes se producen principalmente en niños pequeños con miocarditis aguda o meningoencefalitis. Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) calculan que del 20% al 30% de los humanos infectados con *T. cruzi* desarrollan eventualmente enfermedad crónica; los cálculos de otras fuentes varían del 10 al 50% <sup>(57)</sup>.

Generalmente mata a personas en el rango de edad de 30 a 50 años <sup>(55)</sup>. Estimaciones realizadas por la OMS señalan que aproximadamente un 27% de los infectados sufrirá daño cardíaco, un 6% evolucionará hacia el desarrollo de megavísceras y un 3% daño neurológico. Un 64% de los infectados no desarrollará sintomatología clínica <sup>(58)</sup>. La fase aguda es clínicamente evidente en niños menores de 10 años; presenta una tasa de mortalidad de 2% a 8%. Su diagnóstico es difícil debido a su heterogeneidad en los hallazgos clínicos, si no recibe tratamiento la mortalidad varía del 5% al 10% <sup>(27), (59)</sup>.

La mortalidad estimada por cardiopatía chagásica es de 45 mil personas al año, es una de las condiciones patológicas con mayor índice de muerte súbita impredecible <sup>(15)</sup>. Su prevalencia es tan importante que el compromiso cardiovascular que genera tiene el mismo impacto que el producido por la enfermedad coronaria en nuestro medio <sup>(19)</sup>. La enfermedad se considera incurable, y sus altas tasas de mortalidad se traducen en centenares de millares de muertes por año; quizás el problema más importante en la enfermedad de Chagas sea la determinación de su patogenia <sup>(55), (34)</sup>. La mortalidad, tiene tres causas principales: mal ventricular, arritmias y fallas al corazón <sup>(60)</sup>.

*Didelphis marsupialis* como modelo silvestre presenta escasa mortalidad, debido a que controla la parasitemia y permite un rápido avance de las formas pleomorfas del parásito más competentes; además se ha revelado que este animal presenta una infección reversible (sangre-glándulas anales-sangre) con nidos de amastigotes en el epitelio de la mucosa y musculatura de la glándula sin evidencia de inflamación <sup>(11)</sup>.

### 5.2.2. Datos mundiales

La enfermedad de Chagas es uno de los problemas más graves de salud en países centro y sudamericanos, afecta de 10 a 18 millones de personas en Latinoamérica <sup>(2), (15)</sup> y 25 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad, caracterizadas por vivir principalmente en zonas rurales y suburbanas, lugares con grandes limitaciones económicas y donde existen actividades agrícolas y ganaderas <sup>(3), (61)</sup>.

Diferentes estudios han logrado determinar algunas asociaciones epidemiológicas de la enfermedad en diferentes regiones, estableciendo así que las manifestaciones gastrointestinales son raras en Centroamérica, México, Colombia y Venezuela mientras que en Brasil estas manifestaciones tienen mayor incidencia <sup>(62)</sup>.

Suramérica se ha caracterizado por el solapamiento de diferentes ciclos de transmisión del parásito, los cuales varían en una zona dependiendo de los diversos huéspedes susceptibles, su posible infección y desplazamiento, lo que conlleva al aumento de la probabilidad de transmisión de la enfermedad <sup>(12)</sup>.

Debido a la capacidad del parásito de reproducirse en diferentes hospederos, se reportan datos de seroprevalencia en animales domésticos como los perros que varían del 1,1% al 8,8%, y animales silvestres tales como mapaches y zarigüeyas del 2% al 62% <sup>(57)</sup>.

### 5.2.3. Datos nacionales

La endemia ha sido reportada en Colombia desde el Siglo XX. Los estudios nacionales muestran más de 15 departamentos de la zona oriental del país en riesgo de transmisión <sup>(16)</sup>. En 1995 se publicó la primera prevalencia nacional de la infección en donantes de sangre en el país; por ello el Ministerio de Salud estableció una ley obligatoria de tamizaje por serología en la sangre de donantes y en 1996 se implementó un programa nacional para el control de vectores de la transmisión de la enfermedad de Chagas <sup>(63), (64), (65)</sup>.

Actualmente está afectada cerca del 5% de la población y el 11% está en riesgo de contraer la infección <sup>(62)</sup>. Se estima que existen alrededor de 436.000 pacientes con enfermedad

de Chagas con una incidencia anual de 5.200 casos de transmisión vectorial y 1.000 casos por infección congénita, con cerca de 5 millones de habitantes en zonas endémicas <sup>(34)</sup>; estas zonas cuentan con registros de infección por *T. cruzi* en perros, primates, armadillos, zarigüeyas, ratas y murciélagos <sup>(9)</sup>, <sup>(66)</sup>.

Existe una prevalencia de 1'300.000 habitantes y alrededor de 3'500.000 individuos están bajo riesgo de adquirir la infección de acuerdo a la distribución geográfica de los insectos vectores <sup>(67)</sup>. Se estableció para el país la presencia de 23 especies, 15 de ellos con infecciones naturales con *T. cruzi* <sup>(68)</sup>.

Según Guhl y col. “las dos terceras partes del territorio de Colombia están ubicadas en la zona ecuatorial; la conformación montañosa, los valles interandinos de diferentes alturas y climas ofrecen un ambiente muy favorable para la domiciliación de varias especies de triatomos” <sup>(67)</sup>. Las principales zonas afectadas están localizadas a lo largo de la cordillera oriental, Magdalena Medio, La Guajira, Llanos Orientales y zonas selváticas del oriente colombiano. Encuestas serológicas muestran porcentajes de positividad en zonas endémicas que varían de 27% a 80% de la población <sup>(19)</sup>.

Un estudio nacional de seroprevalencia y factores de riesgo, realizado en una muestra representativa de la población y viviendas, encontró una prevalencia de infección de 37,5 por 1.000 niños menores de 15 años, principalmente en la región oriental del país. En cuanto a la transmisión vectorial los departamentos con mayor tasa de infestación (% de casas con triatomos) son: Arauca (21,1%), Casanare (10%), Santander (6,3%), Norte de Santander (5,2%), Boyacá (3,7%), Cundinamarca (1,9%) y Meta (1,7%) <sup>(9)</sup>, <sup>(69)</sup>. El Banco Mundial calcula que las pérdidas económicas anuales causadas por la enfermedad de Chagas podrían llegar al 1,3% de la deuda externa de todo el continente <sup>(19)</sup>, <sup>(43)</sup>.

Los estudios sobre triatomos están orientados principalmente a conocer la distribución de las especies domiciliadas y los factores de riesgo de la vivienda <sup>(70)</sup>. *Rhodnius prolixus*, es el principal vector doméstico, seguido de *Triatoma dimidata* y *Triatoma maculata*. Otras especies como *Rhodnius robustus*, *Rhodnius brethesi*, *Rhodnius pallescens* y *Triatoma venosa* viven normalmente en hábitats selváticos <sup>(63)</sup>.

#### 5.2.3.1. Características geográficas

La ubicación de Colombia y su orografía determinan las diferencias en el clima y los ecosistemas, dividiéndose seis grandes regiones biogeográficas que se caracterizan por su fisiografía, vegetación y suelos, lo que se relaciona con la presencia y distribución de

triatominos adaptados al hábitat humano, determinada por factores altitudinales desde los 400 hasta los 2.000 msnm <sup>(67), (71)</sup>.

Colombia se caracteriza por dos épocas de lluvia y dos épocas secas en un mismo año, la duración de la radiación solar es prácticamente igual y la conformación montañosa derivada de la trifurcación andina se extiende a través de todo el país desde el suroeste hasta el noreste abarcando el territorio montañoso con sus valles interandinos de diferentes alturas y climas, ofreciendo un ambiente muy favorable para la domiciliación de varias especies de triatominos <sup>(16), (67)</sup>.

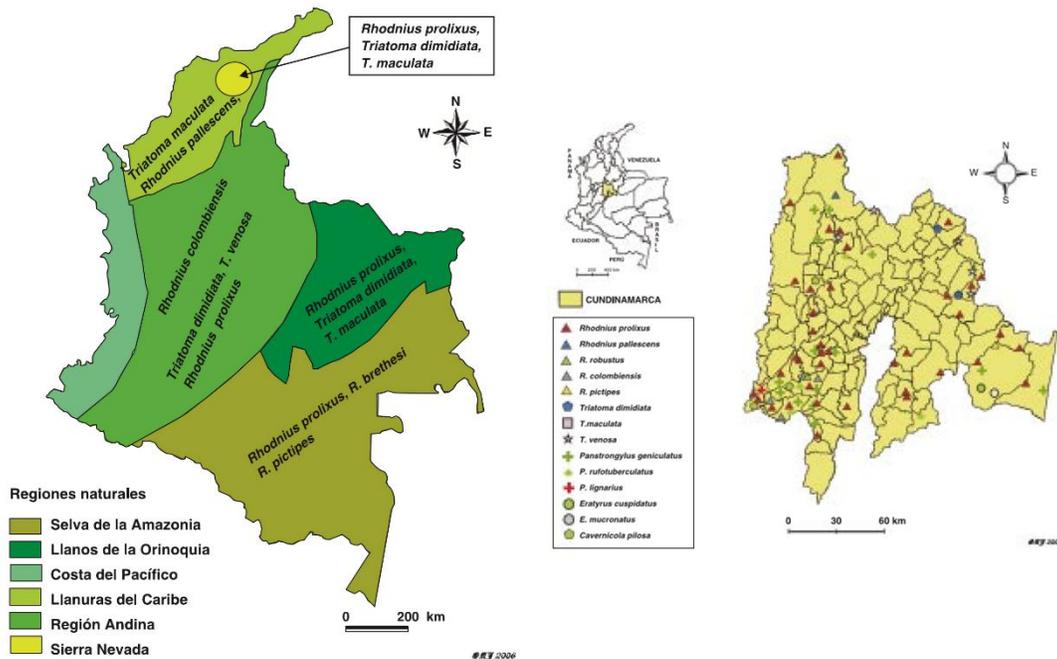


Figura 1. Distribución de triatominos en Colombia y Cundinamarca. Fuente: Elaboración propia. Modificado de Guhl, F; Aguilera, G; Pinto, N; Vergara, D. 2007 <sup>(67)</sup>.

#### 5.2.4. Datos locales

La región Andina presenta sub-regiones con diferentes cinturones horizontales y verticales de clima, vegetación y suelos, incluye los valles interandinos y constituye la región de mayor densidad de asentamientos humanos del país. Aquí se encuentran ampliamente distribuidas las principales especies de triatominos domiciliados: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma venosa*; en los valles interandinos a lo largo del río Magdalena se encuentran ampliamente distribuidas especies silvestres como *Rhodnius colombiensis* y *Panstrongylus geniculatus* <sup>(10), (67)</sup>.

Cundinamarca es un departamento que se caracteriza por tener municipios clasificados dentro de los rangos: alto, medio y bajo riesgo de endemidad para la enfermedad de Chagas, con una tasa de infestación (% de casas con triatominos) de 1,9%, siendo el municipio de La Mesa uno de los clasificados en alto riesgo <sup>(9), (10), (69)</sup>. *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius pictipes*, *Panstrongylus geniculatus* y *Triatoma venosa*, son considerados los principales vectores adaptados a habitantes humanos e índices de infestación domiciliar y prevalencia de infección <sup>(9), (72)</sup>.

La baja incidencia reportada es una posible consecuencia de la omisión del diagnóstico debido a que no se hace búsqueda intencionada de Chagas y las escuelas tocan el tema como una parasitosis tropical de manera superficial, que condiciona al profesional a no pensar en esta enfermedad con los síntomas generales y pasar por desapercibidas <sup>(7)</sup>.

Cundinamarca	<i>C. pilosa</i> *	Girardot (13), Tocaima (13), Villeta (9, 10)
	<i>E. cuspidatus</i> °	Medina (D)
	<i>E. mucronatus</i> °	Medina (D)
	<i>P. geniculatus</i> °	Agua de Dios (D), Caparrapí (D), La Mesa (D), La Palma (D), Medina (D), Nilo (D), Pacho (D), Paime (D), Paratebueno (D), San Antonio del Tequendama (D), Tibacuy (D), Tocaima (D), Viotá (D), Yacopí (D, 9, 10) (D)
	<i>P. lignarius</i> °	(D)
	<i>P. rufotuberculatus</i> °	Guayabetal (D), Nilo (D), Pacho (D)
	<i>R. colombiensis</i> °	Apulo (A), Nilo (A), Viotá (D)
	<i>R. pallescens</i> °	Yacopí (D)
	<i>R. pictipes</i> °	Medina (i)
	<i>R. prolixus</i> °	Agua de Dios (D), Anapoima (D, 7, 13), Anolaima (7, 13, 14), Apulo (7, 13, 14), Cáqueza (7, 13), Choachí (7, 13, 14), El Peñón (D), Fómeque (7, 13, 14), Fosca (D), Fusagasugá (7, 13, 14), Gachalá (D, 9), Gachetá (7, 13), Girardot (7, 13, 14), Guachetá (13), Guaduas (13, 14), Guayabal (13), La Mesa (D, 13, i), La Palma (13, 14, 21), La Unión (Fómeque) (7, 13, 14), La Vega (7, 13, 14), Machetá (7, 13), Manta (7, 13, 14), Medina (D), Mesitas del Colegio (7, 13), Nariño (7, 13, 14), Nilo (D, 7, 13, 14), Pacho (D, 7, 13, 14, 22), Pandi (13), Paratebueno (D), Puerto Salgar (13, 14), San Antonio de Tena (13, 14, 21), San Antonio del Tequendama (D), Tibacuy (D), Tibiritá (7, 13, 14), Tocaima (D, 13, 14), Ubalá (D), Ubaque (13, 14, 21), Villeta (13), Viotá (7, 10, 13), Yacopí (D, 9, 10)
	<i>R. robustus</i> °	Viotá (i)
	<i>T. dimidiata</i> °	Guachetá (13), Machetá (9, 10, 13)
	<i>T. venosa</i> °	El Peñón (D), Manta (D), Paime (D), Tibiritá (D), Villagómez (D)

**Figura 2.** Distribución de triatominos en La Mesa, Cundinamarca, Colombia. (\*) Presencia de *T. cruzi*; (.) presencia de *T. rangeli*; (+) presencia de *Trypanosoma sp*; (°) sin datos disponibles; (°) negativos para *T. cruzi*, *T. rangeli* y *Trypanosoma sp*; (D) Material identificado en el Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical (CIMPAT) de la Universidad de los Andes, Bogotá. Modificado de Guhl, F; Aguilera, G; Pinto, N; Vergara, D. 2007 <sup>(67)</sup>.

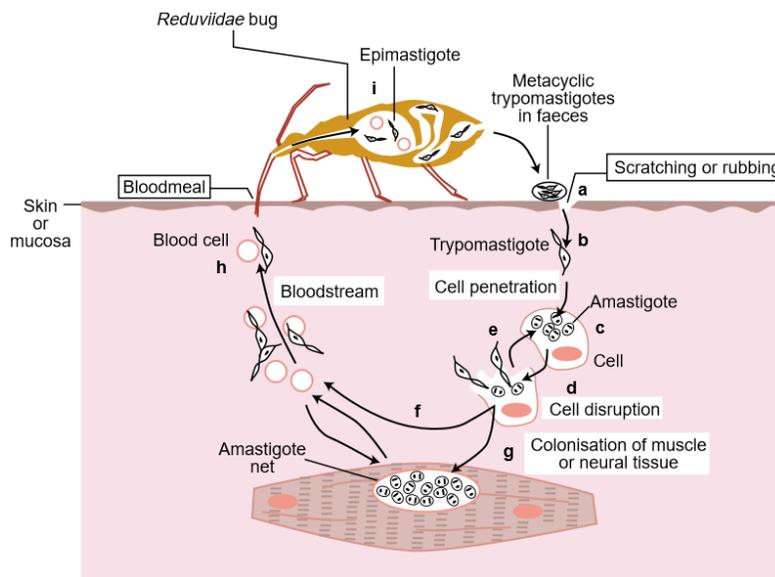
### 5.3. Agente

El agente etiológico *Trypanosoma cruzi* es un protozoo flagelado que utiliza dos hospederos para su ciclo de vida: insectos de la familia Reduviidae (vector), y mamíferos (incluyendo el humano) como reservorios <sup>(11), (35), (45), (52), (73)</sup>, este se encuentra altamente adaptado a la vida parasitaria por lo que es capaz de colonizar casi todos los tejidos de sus cientos de hospederos mamíferos; presentándose en todos los estratos del bosque,

de acuerdo a la fauna de mamíferos existentes <sup>(40)</sup>. Vive a temperaturas entre 24°C a 28°C en los triatominos y entre 36°C a 37°C en mamíferos, sobrevive de 3 a 24 horas en plasma congelado y 1 a 2 semanas en sangre humana a 4°C; si se congela a temperaturas de -70°C el parásito puede durar años <sup>(23),(74), (75), (76)</sup>.

*T. cruzi* es un organismo heterogéneo, con subpoblaciones que varían en relación a su virulencia, patogénesis, infectividad, parasitemia, tropismo tisular, mortalidad durante la fase aguda, características epidemiológicas, manifestaciones clínicas, vulnerabilidad a fármacos y vacunas, morfología, perfiles isoenzimáticos, zimodemas, patrones de aglutinación de lectina, diferenciación en el vector, tiempo de replicación y cinética de crecimiento en medios axénicos <sup>(58), (62), (77), (78)</sup>.

Su reproducción sexual es rara o ausente, se restringe a algunas poblaciones selváticas, por lo que la evolución biológica y genética actual de este parásito se puede explicar por la evolución aislada de líneas clonales múltiples. Los pacientes y vectores podrían infectarse con al menos dos clones genéticamente diferentes <sup>(9), (12), (62),(79), (80), (81)</sup>.



**Figura 3.** Representación esquemática del ciclo de vida del Protozoario flagelado *T. cruzi*. Tomado de Macedo, A. 2002 <sup>(82)</sup>.

### 5.3.1. Taxonomía

*T. cruzi* es un protozoario flagelado digenético <sup>(73)</sup>, perteneciente al Phylum: *Euglenozoa*, Clase: *Zoomastigophorea*, Superclase: *Mastigophora*, Orden: *Kinetoplastida*, Familia: *Trypanosomatidae*, Sección: *Stercoraria*, Subgénero: *Schizotryparum* y Género: *Trypanosoma* <sup>(11), (13), (19), (23), (83)</sup>.

### 5.3.2. Características morfológicas

*T. cruzi* presenta cuatro estadios morfológicos en su ciclo de vida, cada uno con diferentes características fisiológicas y variación antigénica demostrada. Ellos son: el tripomastigote (forma infecciosa para el hospedador definitivo y el vector), el epimastigote (forma de multiplicación en el vector y en cultivo) y el amastigote (forma de multiplicación en el hospedador vertebrado y en cultivos celulares) <sup>(19), (51)</sup>. Sus diferentes estadios se caracterizan por la presencia de un organelo similar a una mitocondria de gran tamaño denominada cinetoplasto <sup>(11), (13), (19)</sup>.

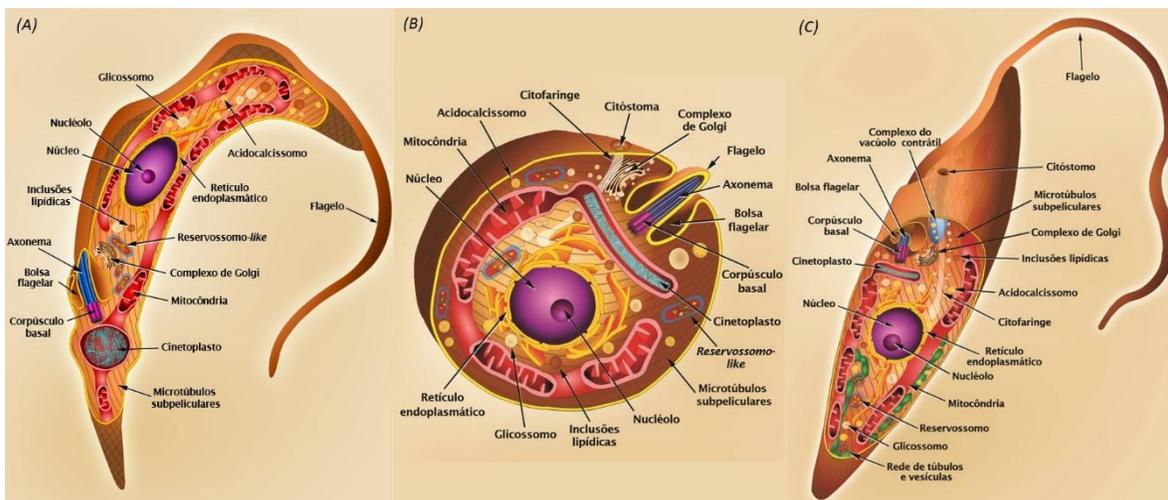


Figura 4. Formas celulares de *T. cruzi*; (A) Tripomastigote, (B) Amastigote, (C) Epimastigote. Modificado de Teixeira, E; Benchimol, M; Crepaldi, P; de Souza, W. 2011 <sup>(76)</sup>.

#### 5.3.2.1. Formas celulares

El ciclo biológico se completa al infectar la sangre, otros tejidos de los reservorios y en el tubo digestivo del vector, lugares en donde el protozooario sufre las siguientes transformaciones:

- Tripomastigote: Presente en la sangre de los humanos y en el insecto vector, es de aspecto fusiforme, en forma de C o S, mide 20um de largo por 1um de ancho, posee citoplasma granuloso, en la unión de los dos tercios posteriores con el anterior se localiza el núcleo elipsoidal vesiculoso, en el extremo posterior se observa el cinetoplasto, el anoxema parte del cuerpo basal, situado dentro de la bolsa flagelar, el cual corre a lo largo del cuerpo parasitario en el exterior con pocas ondulaciones, el espacio estrecho intermedio es ocupado por la membrana ondulante <sup>(13), (19), (22), (23) (52), (58), (84)</sup>.

- Amastigote: Se encuentra al infectar las fibras del músculo cardiaco estriado, el sistema neurovegetativo del tubo digestivo o a los fagocitos, acorta su flagelo adoptando una figura circular de 2 a 4µm de diámetro; presenta núcleo y cinetoplasto y se multiplica por fisión binaria formando racimos o nidos que llenan la célula hospedera comúnmente llamados “nidos de amastigotes”, hasta producir su ruptura, los parásitos liberados se convierten en promastigotes y tripomastigotes que invaden otras células <sup>(13), (19), (22), (23), (52), (58), (84)</sup>.
- Epimastigote: Luego del consumo de sangre humana o de otro vertebrado se forman en el intestino del vector, en donde se multiplican por fisión binaria en el interior del tubo digestivo del triatomino. Es fusiforme, mide de 20 a 30µm, presenta núcleo y cinetoplasto en la parte central del parásito, esta forma se presenta en medios de cultivo. Al cabo de 15 a 30 días en el recto aparecen los tripomastigotes metacíclicos infectantes que entran al organismo y son fagocitados por los macrófagos regionales y englobados en un fagosoma de donde escapan y se dirigen al citoplasma <sup>(13), (19), (22), (23), (52), (58), (84)</sup>.

### 5.3.3. Material genético

*T. cruzi* es un organismo diploide con un genoma que se distribuye en pares de cromosomas homólogos y que en general varía en tamaño debido a las unidades de repetición o secuencias no codificadoras; estudios de localización de genes presentes en copia única como los genes de mantenimiento (housekeeping), evidenciaron que el parásito no presenta meiosis. El tamaño y número de cromosomas donde están contenidos estos genes (locis) varía ampliamente entre las cepas, lo que sugiere que existe un fenómeno de translocación de los mismos. Su patrón de hibridación se modifica en función del tiempo de cultivo de los parásitos, lo que sugiere que el paquete de genes del miniexón pudiera ser la principal causa de rearreglo y transposición <sup>(73), (85), (86)</sup>.

Los genes de *T. cruzi* se encuentran en grupos o familias arreglados en tándem con secuencias intergénicas y sin intrones; sin embargo, también se encuentran genes de única copia arreglados en tándem junto a genes diferentes, cada uno flanqueado por secuencias únicas <sup>(87)</sup>. El tamaño de su genoma diploide esta entre 106,4 y 110,7 Mb con un número estimado de 22.570 genes codificantes. Al menos un 50% de este, está constituido por secuencias repetidas <sup>(19), (21), (83), (88), (89)</sup>.

La diploidía del parásito es tema de controversia pues no se han detectado nunca formas sexuales, la condensación cromosómica durante la mitosis y la división binaria impide distinguir entre fusión y división; no obstante, diferentes evidencias apuntan a que son organismos diploides, aunque se desconoce el intercambio de material genético entre

individuos <sup>(19), (90)</sup>, se observa la ausencia de segregación alélica y de recombinación genética, lo que indica que la reproducción sexual, es muy restringida por lo cual sus poblaciones circulantes tienen básicamente una estructura clonal, que permite la proliferación de los clones que mejor se adaptan al medio, dejando el intercambio genético especialmente en el ciclo selvático <sup>(58), (83), (89), (91), (92),(93),(94), (95), (96)</sup>.

Se ha sugerido que debió existir intercambio genético entre linajes, idea que es apoyada por el análisis de dos enzimas nucleares (triptanotio reductasa y dihidrofolato reductasa-timidilato sintetasa) y dos enzimas mitocondriales (subunidad II del citocromo C oxidasa y de la NADH deshidrogenasa), estas observaciones llevan a preguntar si los tripanosomas tuvieron un origen monofilético o si provienen de más de dos ancestros. Estudios más recientes sugieren que todos los tripanosomas sanguíneos de vertebrados son monofiléticos (un solo origen) y que su ancestro debió ser un parásito de insectos que se adoptó a los vertebrados <sup>(73), (84), (97)</sup>.

Es importante reconocer que existen diferentes clones circulantes en los hospederos y el transmisor, estas poblaciones de parásitos se van seleccionando al pasar de vector-hospedero-vector; entonces el conocimiento de su organización genómica, los mecanismos de regulación de la transcripción y postranscripción son elementos determinantes que podrían ayudar a explicar su evolución <sup>(73)</sup>. El pleomorfismo de la enfermedad de Chagas ha sido atribuido a la diversidad de cepas de *T. cruzi* y a su estructura multiclonal compleja, con evidencia de cambios genéticos entre los linajes <sup>(98)</sup>.

En relación a la filogenia, se sabe que si un organismo tiene un comportamiento clonal, su información genética deberá mantenerse intacta, cabe aclarar que es difícil determinar si un organismo ha evolucionado de forma clonal por divergencias o intercambios genéticos, debido a que muchas veces no se conoce con exactitud cuál era el comportamiento del mismo organismo millones de años atrás y solo se tienen datos de su evolución a través de algunos genes y la construcción de árboles filogenéticos. Hablamos de una evolución convergente (homoplasia) cuando la misma característica evoluciona o aparece en dos linajes diferentes, mientras que un carácter ancestral es cuando se ha dado origen a características derivadas de este en diferentes organismos (homología) <sup>(73)</sup>.

Es sabido que si el flujo génico entre poblaciones de una especie es alto, todas ellas evolucionan de manera conjunta, pero si es muy bajo, empiezan a divergir, lo que contribuye al aislamiento y al establecimiento de linajes evolutivamente independientes <sup>(9)</sup>.

El genoma de *T. cruzi* está situado en dos compartimientos celulares bien definidos, núcleo y cinetoplasto <sup>(58)</sup>, cuenta con una gran cantidad de ácido desoxirribonucleico (ADN) telomérico. Otras secuencias altamente repetitivas y específicas están constituidas por el denominado ADN satélite, que en *T. cruzi* está conformado por 195 pares de bases (pb) y constituye el 9% del ADN total equivalente a 120.000 copias por núcleo <sup>(19)</sup>. Estudios de aloenzimas o fragmentos de restricción de ADN del cinetoplasto (kADN) han mostrado un marcado polimorfismo en poblaciones naturales de *T. cruzi* (esquizodemas). Por otra parte, el análisis de isoenzimas mediante electroforesis (zimogramas) ha permitido la clasificación de parásitos aislados de diferentes hospederos en categorías llamadas zimodemas <sup>(58)</sup>.

#### 5.3.3.1. Regulación de la expresión génica

La transcripción de los genes estructurales en *T. cruzi*, en general es de forma constitutiva, transcritos a una misma proporción o cantidad, en forma policistrónica como ARNs precursores o inmaduros; estos genes están acomodados en grupos o paquetes y seguido uno tras otro con espacios intergénicos cortos. Los ARNm maduros monocistrónicos son generados de transcritos primarios por los eventos de trans-splicing y poliadenilación. En el proceso de trans-splicing al pre-ARNm policistrónico se le adiciona en su extremo 5' una secuencia de aproximadamente 39 pb llamada spliced leader (SL) o miniexón, procedente de la molécula denominada ARNmed de aproximadamente 140 pb <sup>(73)</sup>. Finalmente, mediante la poliadenilación en la región 3' se generan los ARNm maduros o estabilidad del producto de traducción <sup>(73), (99)</sup>.

La regulación de la expresión de los genes de *T. cruzi* ocurre a nivel post-transcripcional, como es el transporte al citoplasma, regulación del procesamiento del transcrito primario (trans-splicing y poliadenilación), estabilidad del ARNm, movilización del ARNm hacia los polisomas, eficiencia de traducción y modificaciones post-transduccionales <sup>(73), (83)</sup>.

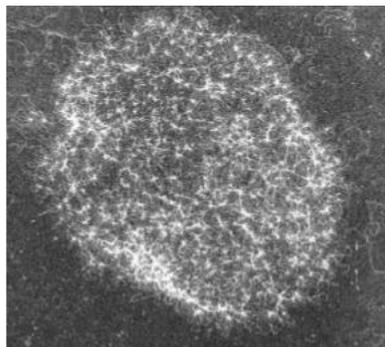
#### 5.3.3.2. ADN del cinetoplasto

Al igual que en otros eucariotas las mitocondrias de estos parásitos contienen ADN, aunque de nuevo con unas características muy especiales. El cinetoplasto es la característica propia del orden, constituida por una masa circular con tres espirales de ADN fibrilar, circular y lineal (kADN) alojadas dentro de una expansión capsular de la mitocondria compuesto por miles de círculos concatenados que constituyen del 10% al 25% del total de la célula según la especie <sup>(19), (58), (76), (84)</sup>.

El cinetoplasto está constituido por dos tipos de círculos: maxicírculo y minicírculo. El maxicírculo con 1.6 Kpb posee de 20 a 50 copias idénticas de maxicírculos que son similares al ADN mitocondrial de los eucariontes superiores y codifican ARNs ribosomales y proteínas involucradas en la generación de ATP <sup>(58), (87)</sup>.

Los minicírculos con 1.4 Kpb, presentan heterogeneidad y están constituidos por cuatro subunidades, cada una contiene una secuencia homóloga y otra variable, que representan cuatro regiones de secuencia altamente conservada, las cuales están regularmente distribuidas cada 90° entre sí y con un tamaño cercano a los 120 pb. Así también, contiene cuatro regiones hipervariables en secuencias de tamaño cercano a 250 pb <sup>(58)</sup>.

Con unos 3.000 a 30.000 minicírculos, el *T. cruzi* tiene unas 120.000 copias de secuencia homóloga, un número similar de copias al ADN satélite. Estas secuencias de tan alto número de repetición han sido usadas en el desarrollo de métodos de diagnóstico basados en su amplificación por PCR que han demostrado una capacidad de detección del parásito extrema, hasta un solo parásito en 10cc de sangre <sup>(3), (19), (55)</sup>.



**Figura 5.** Red de ADN del kinetoplasto de *T. cruzi*. Tomado de Miquelès, C. 2005 <sup>(58)</sup>.

#### 5.3.4. Ciclo de transmisión

El parásito cuenta con la capacidad de mantener distintos ciclos de transmisión entre hospedadores sinantrópicos; característica que lo convierte en uno de los organismos más exitosos en adoptar el modo de vida parasitaria, lo cual explica la dificultad de la interrupción de su transmisión <sup>(12)</sup>. Muchas especies de mamíferos y triatomíneos, se encuentran asociados en hábitats domésticos, peridomésticos y silvestres de todo el territorio colombiano <sup>(16), (100)</sup>.

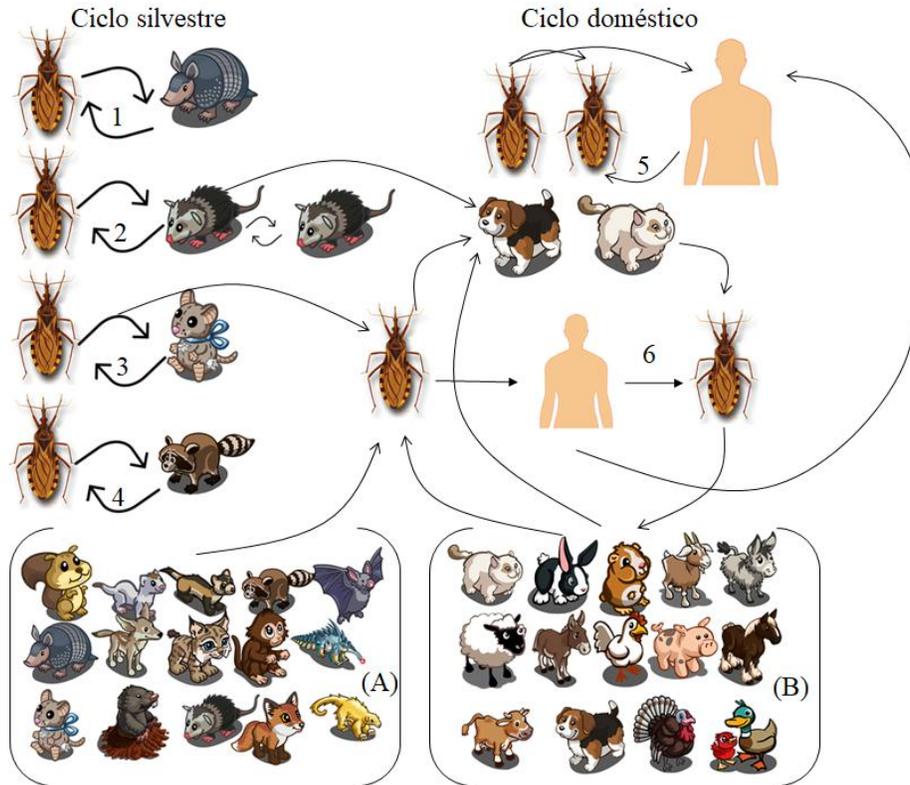
*T. cruzi* se caracteriza por presentar en el ambiente de dispersión tres ciclos: el ciclo doméstico que involucra al hombre, animales domésticos y sinantrópicos y triatomíneos

domiciliados; el ciclo peridoméstico en el cual intervienen una gran variedad de mamíferos como roedores, marsupiales y perros que entran y salen libremente de las viviendas y triatomas silvestres atraídos a las casas por la luz y el alimento; este ciclo sirve de nexo entre los ciclos doméstico y silvestre <sup>(9)</sup>; y, finalmente, el ciclo silvestre que involucra animales y triatomos silvestres <sup>(12)</sup>.

Estos pueden ocurrir de manera simultánea e independiente, involucran distintos vectores y reservorios con diferentes grados de solapamiento por la acción de un vector doméstico en el medio silvestre como de forma inversa. Ambas formas ingresan gradualmente al entorno en las áreas naturales de explotación, lo que genera un aumento en la frecuencia de los brotes ocasionados por contaminación oral, producto de la exposición humana al ciclo silvestre <sup>(12)</sup>.

Los ciclos de transmisión de *T. cruzi* se pueden considerar como sistemas complejos debido a su no linealidad, la imprevisibilidad y la naturaleza multivariable. El examen de las interacciones huésped-parásito desde la perspectiva de los sistemas complejos e interdependientes es la forma más adecuada para comprender la epidemiología de ciclos de transmisión <sup>(40)</sup>.

Las investigaciones recientes corroboran la opinión clásica de que los perros y los gatos constituyen un elemento importante en los ciclos de transmisión doméstica del parásito por *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* al igual que los roedores y zarigüeyas que representan un papel importante en dicho ciclo <sup>(6)</sup>. Este tipo de dispersión ha dado como resultado a la transformación evolutiva de focos de transmisión enzoóticas en hábitats restringidos a las redes complejas interconectadas por especies domésticas y salvajes con una amplia distribución geográfica <sup>(101)</sup>.



**Figura 6.** Posibles modalidades y relaciones entre los ciclos de transmisión de *T. cruzi*. Convenciones: 1) Triatominos asociados a armadillos; adultos entran a las viviendas atraídos por luz, 2) zarigüeyas asociadas con varias especies de triatominos, ambos invaden construcciones humanas 3) ratas y otros roedores asociados con triatominos que también invadirán las viviendas; 4) mapaches asociados con triatominos, y como las zarigüeyas podrían transmitirse *T. cruzi* en forma horizontal; 5) y 6) Transmisión doméstica con y sin participación de los animales domésticos. (A) Animales silvestres asociados a la transmisión por *T. cruzi* de izquierda a derecha y de arriba abajo; ardilla, comadreja, hurón, murciélago, armadillo, coyote, lince, mono, oso hormiguero, ratón, tuza, zarigüeya, zorro, oso perezoso; (B) Animales domésticos asociados a la transmisión por *T. cruzi*; de izquierda a derecha y de arriba abajo, gato, conejo, cobayo, cabra, asno, oveja, mula, gallina, cerdo, caballo, vaca, perro, pavo, pato. Fuente: Elaboración propia, modificado de Ceballos, L. 2010; Zeledón 1974 y Herrera, L. 2014 (5), (6), (7), (9), (12), (19), (20), (21), (25), (29), (39), (57), (58), (71), (75), (84), (102), (103), (104), (105), (106), (107), (108).

#### 5.3.4.1. Ciclo doméstico

El ciclo doméstico, es el de mayor importancia para la salud pública <sup>(12)</sup> caracterizado por la presencia del insecto vector y el hombre u otros animales domésticos o sinantrópicos, o ambos <sup>(5)</sup>. Su papel se reserva prioritariamente para aquellos mamíferos que son animales de compañía o de extrema cercanía al ser humano como perros y gatos <sup>(8)</sup>, <sup>(12)</sup>, <sup>(84)</sup>.

#### 5.3.4.2. Ciclo peridoméstico

La costumbre de mantener a los animales domésticos como pollos, cerdos, cabras o vacas en o cerca de la casa a menudo significa que un gran número de triatominos puedan estar asociados a estos animales, lo que les permite invadir fácilmente la vivienda <sup>(5), (61)</sup>; de especial importancia resultarían aquellos hábitos sinantrópicos que coexisten paralelos con el hombre en el domicilio y peridomicilio, pero también en condiciones de vida silvestre con animales como comadrejas, roedores, etc <sup>(8)</sup>.

Las ratas y el zorro pelón (zarigüeyas) son conocidas como el principal reservorio peridoméstico <sup>(9),(45)</sup>. *Rhodnius prolixus* es el vector que más se asocia a la transmisión del parásito a zarigüeyas, y aunque se sabe que este animal ocupa el mismo hábitat selvático tiene la capacidad de colonizar viviendas humanas, por lo tanto se considera como un vínculo entre los ciclos selváticos y domésticos <sup>(109)</sup>.

#### 5.3.4.3. Ciclo silvestre

El ciclo silvestre de la transmisión de *T. cruzi* posee una amplia distribución geográfica, a lo largo de toda América se han hallado infectadas naturalmente con *T. cruzi* más de 150 especies de mamíferos silvestres como zarigüeyas, marmosas, zorros, zorrinos, hurones, gatos monteses, mapaches, primates, armadillos, murciélagos y roedores de varias especies <sup>(12), (41)</sup>. Fue Chagas quien además de definir la enfermedad, hizo el descubrimiento del primer hospedador silvestre, una especie de armadillo (*Dasypus novemcincus*) <sup>(12), (84)</sup>.

Se ha demostrado que una mayor acción humana, corresponde a la mayor simplificación de la fauna, con un predominio de los animales sinantrópicos tales como marsupiales y roedores que pueden moverse entre los ambientes humanos y silvestres <sup>(101)</sup>.

Este ciclo de transmisión es originado por una predación de sangre de los triatominos sobre los mamíferos reservorios y una predación entomófaga de los triatominos infectados por parte de los mismos mamíferos reservorios, que establecen de esta forma una puerta de infección orodigestiva que garantiza altas cifras de prevalencia de la infección para estos vertebrados <sup>(6), (8)</sup>.

El análisis de la ingestión de sangre de los triatominos, indica que los marsupiales (probablemente *Didelphis albiventris*) son importantes como recurso alimenticio y de infección de *T. cruzi* para los insectos <sup>(110)</sup>. Esto se debe a una relación aparentemente muy antigua que proporciona equilibrio entre parásito y hospedero, sin causar daño a

alguno de los dos. Por ello se presta gran atención a los reservorios salvajes capaces de acercarse al humano, especialmente algunos marsupiales y roedores <sup>(61)</sup>. Varias especies de triatomíneos conforman el ciclo silvestre de *T. cruzi*, tales como *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius pallescens* <sup>(9)</sup>.

### 5.3.5. Clasificación del agente

La intensa presión evolutiva a la que han sido sometidos estos microorganismos los ha llevado a ser maestros en sobrevivir en condiciones adversas mediante el mantenimiento de estructuras evolutivamente antiguas y el desarrollo de nuevos mecanismos bioquímicos con amplia repercusión en la expresión de la información genética <sup>(19), (111)</sup>.

El análisis global de diferentes estudios destacan que *T. cruzi* presenta una gran variabilidad genética que se ha estudiado con diferentes herramientas biológicas, bioquímicas y moleculares <sup>(12), (51), (83)</sup>.

#### 5.3.5.1. Biodemas

Basados en las observaciones del comportamiento biológico y morfológico en algunos aislados de *T. cruzi* en modelos animales se propuso, la clasificación de estos en biodemas:

- Biodema I: está constituido por aislados de rápido crecimiento *in vitro*, alta parasitemia y mortalidad en el modelo murino. Las formas infectivas tripomastigotas se caracterizan por ser delgadas, con extrema virulencia y tropismo por células del sistema fagocítico <sup>(11), (83), (111), (112)</sup>.
- Biodema II: caracterizado por la presencia de formas infectivas gruesas miotrópicas de baja virulencia, crecimiento lento *in vitro* y picos de parasitemias irregulares <sup>(11), (83), (111), (112)</sup>.
- Biodema III: típico de los aislados colombianos, tienen multiplicación lenta y picos de parasitemia retardados hasta de 20 a 30 días post-inoculación en los ratones y baja mortalidad hasta de 50 días post-infección. Las formas infectivas son morfológicamente gruesas y con tropismo por el músculo esquelético <sup>(11), (83), (86), (111), (112)</sup>.

### 5.3.5.2. Zimodemas

La caracterización bioquímica de *T. cruzi* por isoenzimas se llevó a cabo inicialmente por Miles y col. a finales de la década de los 70<sup>(51),(83)</sup>, revelan la variedad isoenzimática entre diferentes aislados que los definen en tres grupos principales “zimodemas”<sup>(63),(79)</sup>. Un zimodema incluye todos los parásitos que muestran patrones idénticos para un grupo de enzimas, lo que apoya la hipótesis de clonalidad de los marcadores específicos del kADN y del ADN nuclear que son transmitidos en conjunto a la progenie<sup>(23),(58),(91),(111)</sup>.

Estos son equivalentes a los grupos *T. cruzi* I, *T. cruzi* II y *T. cruzi* III, respectivamente. *T. cruzi* I corresponde a cepas de menor heterogeneidad, y las cepas caracterizadas como *T. cruzi* II y *T. cruzi* III constituyen un mismo grupo; *T. cruzi* II a su vez contiene cinco subdivisiones: *T. cruzi* IIa, IIb, IIc, IId y IIe<sup>(51),(73),(112)</sup>.

Zingales y col. en el 2009, demostraron un fuerte vínculo entre el linaje 1 y el ciclo de transmisión doméstico con el zimodemo grupo Z2 en los países del cono Sur, y entre el linaje 2 con el zimodemo grupo Z1, con características domésticas y silvestres en regiones del norte de la amazonia, y zimodemo grupo Z3 con características silvestres en la región amazónica; situación que se ha observado en Colombia<sup>(11),(58),(63),(83),(109),(111)</sup>.

### 5.3.5.3. Esquizodemas

Diferentes poblaciones de parásitos han sido también realizadas por estudios del polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción de kADN (RFLP). Los parásitos que exhiben el mismo patrón de RFLP pertenecen a un mismo esquizodema. Los zimodemas y esquizodemas, son genes estructurales nucleares que codifican enzimas y kADN, las cuales presentan una evolución paralela<sup>(58),(112)</sup>.

### 5.3.5.4. Unidades Discretas de Tipificación (DTUs)

Recientemente *T. cruzi* ha sido clasificado en seis unidades discretas de tipificación, “Discrete Typing Units” (DTU) cuya nueva nomenclatura corresponde a la conservación del linaje TcI anteriormente llamado *T. cruzi* I y TcII que corresponde al denominado *T. cruzi* IIb, TcIII a *T. cruzi* IIc, TcIV a *T. cruzi* IIa, TcV a *T. cruzi* IId y TcVI a *T. cruzi* IIe<sup>(8),(22),(83),(93),(110),(111),(113),(114)</sup>.

Estas presentan una variedad en la distribución geográfica, asociación ecoepidemiológica<sup>(98)</sup>, características biológicas, bioquímicas y moleculares. Una DTU

es una colección de stocks de *T. cruzi* que están más estrechamente relacionadas entre sí y que han sido caracterizadas con marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos <sup>(9), (12), (40), (83), (90), (105)</sup>. Estos DTUs se distribuyen diferencialmente entre las diversas especies de triatominos, hospedadores y hábitats <sup>(12), (86), (104), (115)</sup>.

Se ha podido establecer que los clones tienen un tropismo específico a diferentes tejidos y es exactamente su distribución lo que puede influir o determinar el curso clínico de cada paciente que a su vez contribuye a diferentes patrones de manifestación clínico-patológicas en un área geográfica determinada lo que se conoce como el modelo histotrópico clonal <sup>(62),(82)</sup>. Cuando la infección por *T. cruzi* se presenta con más de un DTU en el mismo hospedero, representa las características más interesantes y desafiantes sobre la evolución clínica de la enfermedad de Chagas <sup>(84),(116), (117)</sup>.

- TcI es el mayor causante de enfermedad de Chagas y el DTU más extendido de la naturaleza, presente en norte de Sur América y Centro América <sup>(9), (41), (115)</sup>; las teorías sugieren que evolucionó junto con los marsupiales, asociado con una presentación aguda y formas cardíacas de la infección crónica <sup>(11), (115)</sup>, más virulenta e infectiva en humanos por su tropismo hacia el corazón, músculo esquelético y recto <sup>(20), (116), (118)</sup>; predomina en ciclos selváticos y ha sido aislado de mamíferos marsupiales del género *Didelphis* (zarigüeyas) y redúvidos de la tribu *Rhodniini*, que se localizan en hábitats con presencia de palmeras <sup>(12), (98)</sup>. Presenta un mayor crecimiento en condiciones de cultivo, y está asociado con infecciones mixtas con TcII <sup>(41), (64), (85)</sup>.

Este clon está constituido por aislados que presentan cuatro haplotipos diferentes que van desde el Ia hasta el Id <sup>(83), (119), (120)</sup>. Los genotipos Ia y Ib se encuentran principalmente asociados a la infección doméstica y la presencia de *Rhodnius prolixus*; el genotipo Ic a ambientes peridomésticos y el genotipo Id a *Triatoma dimidiata* y ambientes selváticos, lo que sugiere una gran variabilidad intraespecífica <sup>(9)</sup>. En Colombia y regiones de sur América, se han reportado los 4 genotipos anteriormente nombrados de TcI <sup>(115)</sup>.

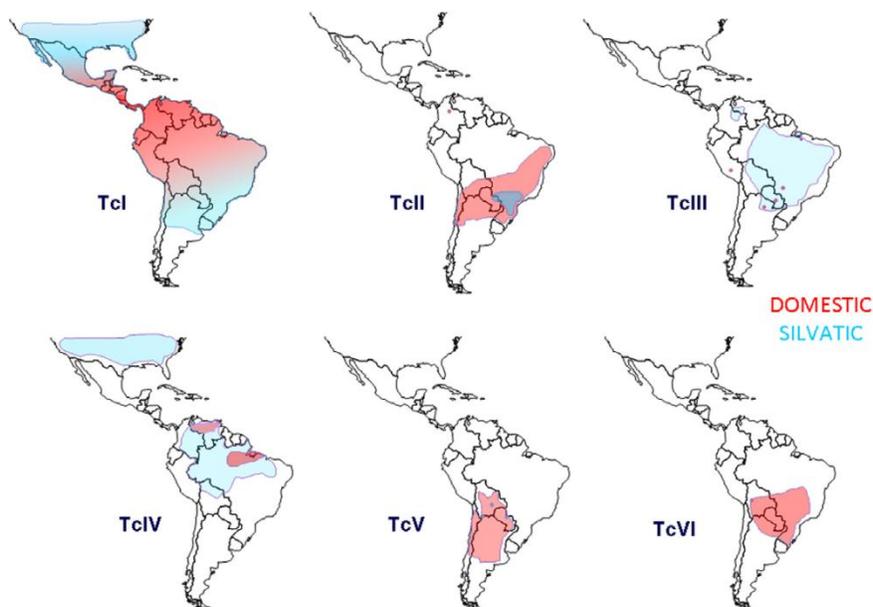
- TcII circula mayoritariamente en países del cono sur de Sudamérica <sup>(9), (41)</sup>, se asocia a parasitemias menores e infecciones de menor gravedad <sup>(51)</sup>; este clon sufrió una separación a partir de la coevolución de roedores cavimorfos y primates <sup>(11)</sup>; predomina en el ciclo doméstico, se ha aislado a partir de mamíferos terrestres y redúvidos de la tribu *Triatomini*. Se identifica tanto en infecciones agudas como crónicas, en casos de cardiopatías y formas digestivas (megaesófago y megacolon) <sup>(51), (85), (98), (116)</sup>.

Estudios realizados evidencian mayor capacidad de proliferación de TcII en comparación con TcI debido a su alta infectividad y capacidad de multiplicarse en un

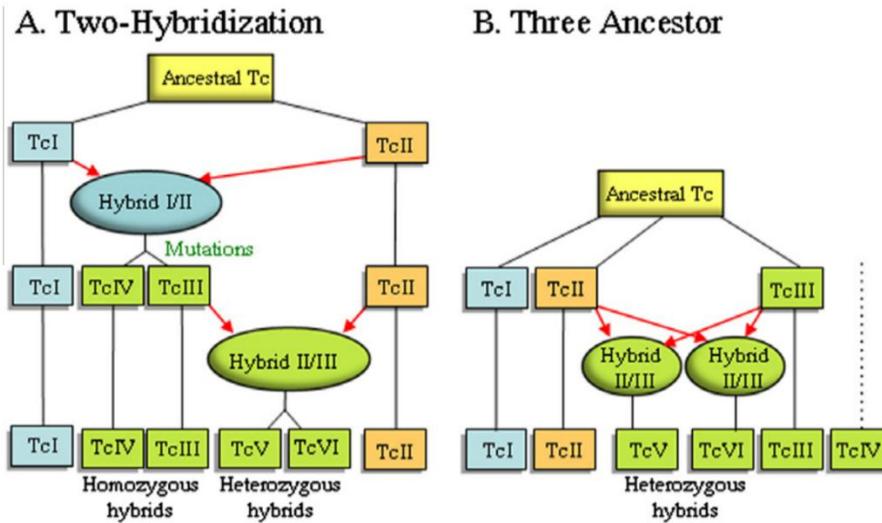
corto tiempo de duplicación en sangre de ratones infectados experimentalmente, por lo tanto, la genicidad del parásito y la capacidad de infección están totalmente asociados a la respuesta inmune del huésped <sup>(86),(116), (121)</sup>.

- TcIII es un producto de recombinación entre TcI y TcII <sup>(115)</sup>, circula en el ciclo selvático <sup>(9)</sup>, ha sido aisladas a partir de diferentes mamíferos terrestres compartiendo nichos ecológicos con TcI y TcII <sup>(51)</sup>. Múltiples evidencias sugieren que los mamíferos que habitan cuevas (tales como armadillos y zorrillos) están asociados a este DTU y en menor medida con TcII y TcV <sup>(12), (41), (84), (86), (122)</sup>.
- TcIV es un producto de recombinación entre TcI y TcII <sup>(115)</sup>, posee una amplia gama de huéspedes mucho más grande, se ha aislado de primates, coatíes, marsupiales, murciélagos y roedores; se encuentra asociado con el ciclo doméstico y silvestre en la región del Amazonas, Colombia y Venezuela <sup>(41), (86)</sup>.
- TcV y TcVI están presentes en el ciclo doméstico <sup>(9)</sup>, se encuentran mayormente asociados a la manifestación crónica de la enfermedad y a los ambientes antrópicos <sup>(12), (115)</sup>; estos DTU son considerados híbridos, los cuales son productos de recombinación de TcII y TcIII <sup>(86), (115)</sup>.

La complejidad de los fenómenos de recombinación deja en evidencia que hay varios aspectos que aún requieren aclaración; las infecciones mixtas pueden ocurrir después de la exposición a los diferentes genotipos y especies de parásitos en diferentes intervalos de tiempo y rutas distintas <sup>(41)</sup>.



**Figura 7.** Distribución geográfica aproximada de las DTU de *T. cruzi* en ciclos de transmisión domésticos y selváticos. Tomada de Zingales, B; y col. 2012 <sup>(86)</sup>.



**Figura 8.** Esquema de evolución de los DTUs de *T. cruzi*. Comparación de (A) dos hibridaciones y (B) los tres modelos del antepasado, para los papeles del intercambio genético durante la evolución clónica de *T. cruzi*. La fusión de dos células y el intercambio genético. Tomada de Zingales, y col. 2012 <sup>(86)</sup>.

**Tabla 1.** *T. cruzi* sus ecótopos, huéspedes, vectores y asociaciones con la enfermedad de Chagas. Fuente: Elaboración propia. Modificado de Zingales, B; y col. 2012 <sup>(86)</sup>.

Genotipo	Ecótopo	Huéspedes Silvestres	Vectores	Geografía	Enfermedad de Chagas
TcI Arbóreo	<u>Primario</u> Palmas y huecos de los árboles	<u>Primario</u> <i>Didelphis</i> , roedores arbóreos, primates y tamandúas	<u>Primario</u> Especies de <i>Rhodnius</i>	América Central, Sur América y Norte de América	Se presenta como cardiomiopatía al norte de la Amazonía y esporádicamente en el Cono Sur
	<u>Secundario</u> Tierra rocosa y árida	<u>Secundario</u> Roedores terrestres	<u>Secundario</u> <i>Panstrongylus</i> , <i>Triatoma</i> y <i>Eratyrus</i>		
TcII Conocimiento incompleto	Raramente en ciclos selváticos	Primates del bosque Atlántico, <i>Didelphis</i> y <i>Euphractus</i> (Paraguay)	<i>Triatomini</i>	Cono Sur, esporádicamente hacia el Norte	Se observa cardiomiopatía y megasíndromes en el Atlántico y centro de Brasil
TcIII Presentación clínica poco conocida	Terrestre	Armadillos especialmente <i>Dasybus</i> , <i>Chaetophractus</i> , <i>Euphractus</i> ; <i>Didelphis</i> y <i>Monodelphis</i>	<i>Panstrongylus geniculatus</i>	América del Sur	Raro en humanos y perros domésticos. Se relaciona con casos agudos en la Amazonía Brasileña
TcIV	Arbóreo y algunas veces terrestre	Primates y <i>Nausa nausa</i>	<i>Rhodnius</i> , <i>Panstrongylus</i> y <i>Triatoma</i>	Norte y Sur América	Segunda causa de la enfermedad de Chagas en Venezuela
TcV Conocimiento incompleto	Raro en ciclo silvestre	<i>Dasybus</i> , <i>Euphractus</i> y <i>Octodon</i>	-	Cono Sur, Gran Chaco y Sur de Brasil	Causa cardiomiopatía y megasíndromes en el Cono Sur
TcVI Conocimiento incompleto	Raro en ciclo silvestre	-	-	Cono Sur y Gran Chaco	Produce cardiomiopatía en el Cono Sur

#### 5.4. Vector

*T. cruzi* es transferido de un hospedero a otro por medio de un vector, el insecto hematófago de Subfamilia: Triatominae, Familia: Reduviidae y Orden: Hemiptera <sup>(7)</sup>, conocido por primera vez como barbeiro, ya que habitaba en las casas después de apagar las luces y se ocultaba en el día en las grietas de las paredes y los techos de las casas en busca de refugio, consumiendo la sangre de humanos que habitaban en zonas pobres y de condiciones vitales difíciles <sup>(25)</sup>. Es conocido vulgarmente como chinche, pito, chinche besador, hocicona, vinchuca, chipo, chupa sangre, etc. <sup>(13), (19), (57)</sup>.

El ciclo completo de *T. cruzi* en el triatomo dura de 15 a 60 días, al término del cual es posible detectar el parásito en las deyecciones del insecto, sobre todo en aquellos que presentan una tasa de metaciclogénesis alta, que corresponde a la tasa de transformación de las formas epimastigotas a formas tripomastigotas metacíclicas <sup>(58)</sup>. Cuando un triatomo infectado por *T. cruzi* se está alimentando de sangre, su abdomen se llena y se estimula el reflejo de deyección; así, en las heces u orina se puede encontrar tanto epimastigotes como tripomastigotes metacíclicos <sup>(35), (73)</sup>.

Existen cerca de 92 especies del vector de las cuales 53 son infectantes y característicamente habitan entre los 0 y 2.000 msnm, pero la altura más común es entre 400 y 1.600 msnm. Los triatomos son eclécticos en sus nichos naturales y se encuentran entre 42°N y 46°S <sup>(19), (71)</sup>. Existe cinco factores climáticos suficientes para predecir la distribución del vector: la velocidad del viento, la tasa de precipitación, el tipo de vegetación, la humedad y la temperatura. Las especies de vectores varían de un país a otro, pero las más importantes son *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans* <sup>(19), (22)</sup>.

De las 24 especies de triatomos presentes en Colombia, 15 se han encontrado con infecciones naturales por *T. cruzi*: *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus lignarius*, *Panstrongylus rufotuberculatus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma dispar*, *Triatoma maculata*, *Triatoma venosa*, *Rhodnius brethesi*, *Rhodnius colombiensis*, *Rhodnius pallescens*, *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius prolixus*, *Eratyrus cuspidatus*, *Eratyrus mucronatus* y *Cavernicola pilosa* <sup>(67)</sup>. *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*, se consideran las especies más importantes del género <sup>(57)</sup>.

*Panstrongylus geniculatus* es una especie de hábitat silvestre y doméstico, frecuente en las zonas peridomésticas de Colombia y Venezuela, considerada como euritemica debido a su capacidad de adaptarse a ecótopos muy secos y húmedos y una variedad de hábitats silvestres <sup>(37)</sup>; ha sido asociado a la infección en roedores y marsupiales en ecótopos rurales y domésticos <sup>(71)</sup> y se ha encontrado en madrigueras de armadillos <sup>(5)</sup>; la presencia de TcII y TcIV es introducida por este vector a ciclos domésticos <sup>(115)</sup>.

Los triatominos se caracterizan por una estrategia demográfica tipo K, esto quiere decir que son especies nidíferas que se han adaptado al ambiente que les ofrece una fuente de alimentación más estable, con periodos de vida más largos, desarrollo más lento y mayor talla final. El contacto del triatominos con el hospedero está mediado por señales propias de éste, químicas o por orientación de una fuente térmica; sin embargo, en el caso de encontrarse los insectos a cortas distancias son relevantes el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y el calor emitido por el hospedero, y a mayores distancias serian relevantes las claves olfativas y visuales; como etapa final jugaría un papel importante los quimiorreceptores de contacto encontrados en el estilete <sup>(11), (24), (102)</sup>. Se puede clasificar a estos insectos de acuerdo con su actual relación a las viviendas humanas de la siguiente manera:

- Insectos bien adaptados a las casas, con una muy larga relación con el hombre; son relativamente pocos en ecótopos naturales y por lo general se encuentran sujetos a difusión pasiva por el hombre mismo <sup>(5), (8)</sup>.
- Insectos adaptados o todavía en proceso de adaptación al hábitat humano; en esta categoría encontramos varias especies, algunas de las cuales han tenido un éxito moderado en la adaptación a las condiciones domiciliarias, pero se encuentran en una fase de transición, ya que todavía habitan en numerosos ecótopos naturales <sup>(5)</sup>. Además, los cambios ambientales artificiales favorecen la dispersión de triatominos y la atracción de los insectos a los hogares por fuentes de luz <sup>(101)</sup>.
- Los insectos esencialmente salvajes intentando adaptarse a las viviendas humanas; algunas de estas especies o subespecies se encuentran en América del Norte <sup>(5)</sup>.
- En esencia insectos salvajes, cuyos adultos son ocasionalmente encontrados en o alrededor de las casas, atraídos por las luces, pero al parecer no pueden prosperar en el ecótopo artificial <sup>(5)</sup>.
- Insectos totalmente salvajes que harán de su adaptación a las viviendas algo bastante improbable <sup>(5)</sup>.

#### 5.4.1. Características morfológicas

El tamaño de los adultos varía entre 1,5 y 3 cm de longitud y su color es variado según las especies. La cabeza es alargada y termina en una proboscis recta que en reposo se dobla centralmente sobre el cuerpo y se extiende en el momento de la picadura. Poseen un par de ojos prominentes por delante, de los cuales emergen un par de antenas cuyo punto de implantación diferencia los géneros. El tórax es quitinoso y su segmento

anterior tiene forma de escudo. Las alas son dobles y permanecen dobladas sobre el dorso. Algunas especies no poseen alas pero en general los triatominos son más caminadores que voladores <sup>(12)</sup>. El abdomen puede tener pigmentación de colores vistosos que ayudan en la clasificación <sup>(19)</sup>, <sup>(23)</sup>. Tienen una elevada capacidad de ayuno y de adaptación al ambiente domiciliario a diferentes condiciones climáticas <sup>(12)</sup>.

#### 5.4.2. Ciclo reproductivo

El ciclo reproductivo varía de acuerdo al género y especie del vector, puede ser de cinco meses e incluso menos, es decir, que al año producen dos generaciones, entre ellas encontramos a *T. infestans* y *R. prolixus*; el desarrollo se puede demorar un año o más como *T. dimidiata*, *P. megistus*, *T. sórdida* y *T. brasilienses*. Los factores que afectan el ciclo son la temperatura y la frecuencia con la que el insecto ingiere la sangre <sup>(5)</sup>.

La reproducción la realizan mediante huevos pasando por cinco estadios ninfales antes de llegar al adulto <sup>(12)</sup>. En cada paso mudan de exoesqueleto, lo cual ocurre después de una comida completa de sangre. El desarrollo y crecimiento de las ninfas requiere de temperatura, humedad y alimentación adecuadas. El ciclo completo varía entre las especies y por lo general dura entre 84 y 134 días. La longevidad del vector esta alrededor de un año y depende de la capacidad de ayuno, la cual puede ser de hasta varios meses. Una hembra puede poner entre 1.200 y 1.400 huevos. Tanto los machos como las hembras se alimentan de sangre en cantidad que puede llegar a ser nueve veces su peso <sup>(19)</sup>, <sup>(22)</sup>, <sup>(23)</sup>.

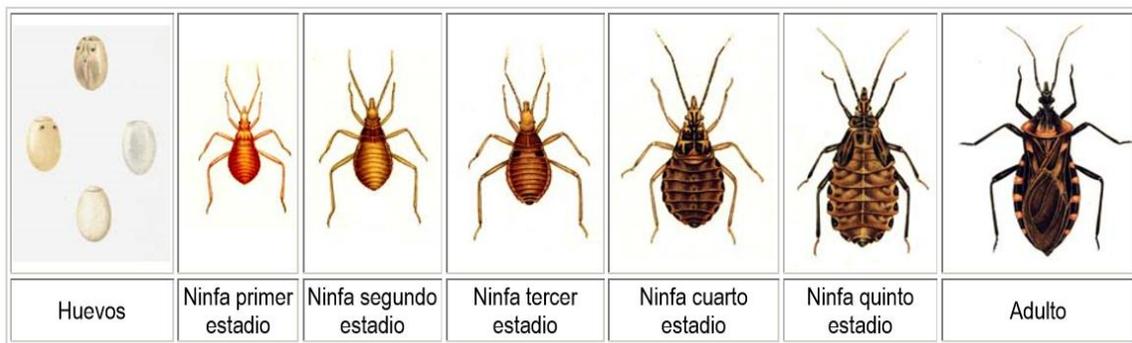


Figura 9. Ciclo de vida del vector. Tomado de Vacca, M; Mercado, M. 2005 <sup>(19)</sup>.

### 5.5. Huéspedes

*T. cruzi* posee dos tipos de hospedadores: los vectores que son insectos hemípteros que se alimentan de sangre (hematófagos) en los cuales se desarrollan dos fases de vida del parásito: epimastigote y tripomastigote metacíclico, y el hospedador intermediario que es

un mamífero (incluido el humano) donde se desarrolla las otras dos fases del parásito: tripomastigote sanguíneo y amastigote <sup>(11), (52), (73)</sup>.

El humano, el perro y la zarigüeya son los reservorios más importantes para *T. cruzi* en los respectivos ciclos, se ha comprobado que los animales son 14 veces más infectivos para propagar la enfermedad y en los animales silvestres la enfermedad transcurre de forma clínicamente inaparente <sup>(11), (29)</sup>; sin embargo, el humano es considerado el reservorio de mayor importancia ya que tiene una amplia expectativa de vida <sup>(11)</sup>.

En condiciones naturales, la transmisión a los mamíferos se produce a través de 1) el contacto de las heces contaminadas del vector con mucosa del mamífero o piel lesionada, 2) la depredación de insectos y mamíferos infectados o alimentos contaminados con heces de triatomíneos (vía oral) y 3) la ruta congénita <sup>(105), (106)</sup>.

#### 5.5.1. Zarigüeya común (*Didelphis marsupialis*)

Los marsupiales de la familia *Didelphidae* varían de tamaño, pequeño a mediano. Presentan una línea frontal media tenue, cola con una escasa pilosidad en la base y con más de la mitad distal blanca. Sus miembros son cortos, los anteriores un poco más que los posteriores y cada uno se encuentra conformado por cinco dedos dotados de fuertes garras, característica que le permite sujetar objetos y mejorar su habilidad trepadora <sup>(84), (123), (124)</sup>.

La alimentación es de carácter omnívoro, comen desde frutas maduras, vegetales, hojas, néctar, flores, invertebrados, pequeños vertebrados, hasta carroña. Se encuentran en un nivel intermedio de la cadena trófica, a menudo se presentan en las casas en busca de comida y en ocasiones se anidan en tejados, formando un vínculo entre el ciclo doméstico y silvestre <sup>(6), (12), (102), (109)</sup>. Actualmente en muchas regiones, debido al aspecto y sabor de su carne, parecidos al pollo, son cazados; no obstante, la población de zarigüeyas puede ser benéfica, debido a que pueden controlar las poblaciones de roedores y artrópodos <sup>(102), (105), (123), (124)</sup>.

Su forma de reproducción es caracterizada por períodos de gestación cortos que van de 8 a 45 días dependiendo de la especie, luego de esto las crías nacen de forma embrionaria y migran a una bolsa llamada marsupio, ubicada en el abdomen y en cuyo interior se encuentran las glándulas mamarias donde se adhieren hasta completar su desarrollo <sup>(75), (123)</sup>.

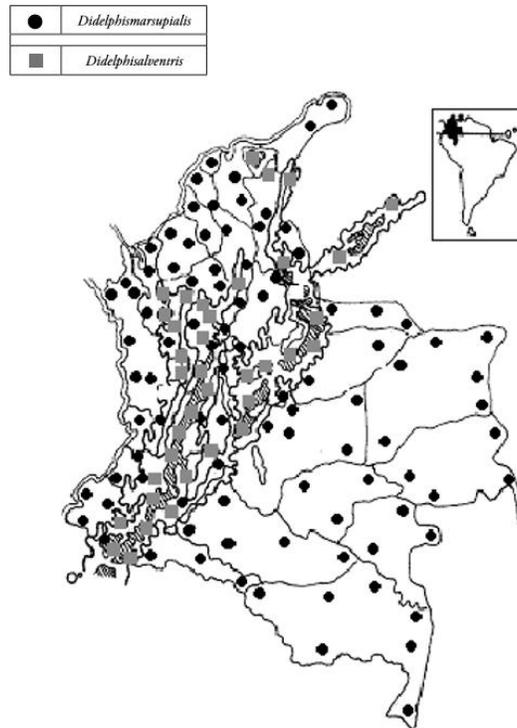
*Didelphis* es la especie más dispersa por el continente americano <sup>(125), (126)</sup>, ocupa casi todo tipo de hábitats a excepción de elevaciones extremadamente altas y zonas

desérticas <sup>(125), (126)</sup> lo que les confiere resistencia a diferentes agentes infecciosos <sup>(126)</sup>. El grado de distribución de la población está directamente relacionado con la disponibilidad de alimento, además de otros factores como fuentes de agua y presencia de vegetación arbórea y arbustiva <sup>(124)</sup>.

Especies y subespecies de *Didelphis* son probablemente los reservorios silvestres de *T. cruzi* más antiguos e importantes del continente americano <sup>(48), (109), (127)</sup>. Este animal presenta parasitemia durante mucho tiempo (posiblemente durante toda su vida) sin signos visibles de la enfermedad <sup>(47), (50)</sup>, debido a su capacidad de controlar la infección, disminuye el número de parásitos en el tejido y las reacciones inflamatorias posteriores <sup>(48), (109)</sup>, encontrándose en buenas condiciones; sin embargo, en ocasiones presenta ligera desnutrición y pelo hirsuto <sup>(107), (126)</sup>.

Este marsupial vive en estrecha asociación con varias especies de triatomíneos de las que se alimenta, de esta manera asegura su infección continua; sin embargo, la parasitemia es de larga duración lo que se debe probablemente a la falta de mecanismos inmunológicos adecuados en estos animales <sup>(5), (13)</sup>. Se origina el riesgo de contaminación oral por heces infectadas del mamífero didelfido <sup>(37)</sup>. Diferentes estudios evidencian que las zarigüeyas y los roedores desempeñan un papel más importante que el perro y otros animales domésticos en la transmisión domiciliar <sup>(6)</sup>.

En ellas, el ciclo del parásito ocurre dentro de las glándulas odoríferas, lo que les confiere la capacidad de expulsar su contenido de manera violenta por marcaje territorial o como respuesta a algún peligro, que hace propensa la contaminación alimentaria sin necesidad del insecto vector <sup>(35), (43)</sup>, en donde son mucho más infecciosas las que comprometen el tegumento o las mucosas del humano <sup>(47)</sup>. *T. cruzi* crece abundantemente como epimastigote y se transforma en tripomastigote metacíclico en el lumen de las glándulas anales imitando el ciclo existente en el vector, y al mismo tiempo presenta un ciclo intracelular con tripomastigotes en torrente sanguíneo demostrando parasitemia persistente <sup>(11), (43), (47), (48), (49), (50), (102), (109)</sup>. Estudios muestran niveles de prevalencia que van desde el 13% hasta el 72% <sup>(54)</sup>, con una capacidad infectiva del 17% al 100% <sup>(48)</sup>.



**Figura 10.** Distribución geográfica de *Didelphis* en Colombia. Tomado de Rueda M, Ramírez G, Osorio J. 2014 <sup>(126)</sup>.

#### 5.5.1.1. Fisiopatología

Se ha registrado miocarditis leve evidente histológicamente (sin signos clínicos de cardiopatía) en la necropsia de mapaches y zarigüeyas salvajes infectados <sup>(57)</sup>. Se encuentran amastigotes en nidos dispersos, principalmente en el músculo esquelético donde la reacción inflamatoria está constituida por linfocitos y macrófagos. Es importante destacar que en los animales infectados experimentalmente, la inflamación es más leve; por el contrario las zarigüeyas infectadas de forma natural muestran nidos de amastigotes ubicados preferentemente en el tracto digestivo y el corazón con inflamación más intensa y destrucción del tejido ocasional <sup>(48)</sup>.

#### 5.5.2. Perro (*Canis lupus familiaris*)

La importancia de los perros en la transmisión de *T. cruzi* ha sido bien documentada en América del Sur, esta parece estar influenciada por: cepa del parásito, dosis infecciosa, salud del huésped y estado nutricional <sup>(42)</sup>, ya que estos tienen una mayor capacidad de infectar vectores triatomíneos sanos que los seres humanos debido a que presentan una parasitemia persistente <sup>(101)</sup>. Es importante destacar que, aunque la enfermedad se

encuentra en una gran variedad de razas, es más común entre las razas deportivas y de trabajo tales como perros labradores y puntero inglés <sup>(42), (128)</sup>.

El hallazgo de caninos infectados es de importancia epidemiológica por su cercanía al hombre <sup>(45)</sup> ya que actúan como reservorios de la enfermedad porque son más propensos a las picaduras de *T. infestans* que los seres humanos <sup>(129)</sup>, por lo que son utilizados como centinelas de la enfermedad en los hogares que habitan <sup>(2), (103), (130), (131)</sup>. Estudios realizados en Argentina han demostrado la importancia del perro como reservorio intradomiciliar en la transmisión del parásito por *T. infestans* <sup>(45)</sup>.

Seroprevalencia en caninos de las américas revela información importante sobre la transmisión a humanos, pues estos animales son catadores del entorno en que se encuentren, pueden consumir insectos e infectarse y poseen capacidad de transmisión vertical <sup>(128),(129)</sup>.

#### 5.5.2.1. Periodo de incubación

El período de incubación para la enfermedad aguda en los perros parece ser entre 5 y 42 días; en infecciones experimentales, los síntomas de la cardiopatía aguda generalmente se registran después de las 2 a 4 semanas. Al igual que en los humanos, es posible que algunos perros no desarrollen signos clínicos hasta la etapa crónica, que se manifiesta después de algunos años, se desconoce la duración exacta del periodo <sup>(57)</sup>.

#### 5.5.2.2. Fisiopatología

La presentación clínica en perros infectados varía desde asintomática hasta la muerte aguda o enfermedades crónicas del corazón. La ausencia de una vacuna o tratamiento canino contra el parásito, complica aún más la gestión de los casos clínicos <sup>(128)</sup>. Los perros infectados experimentalmente pueden desarrollar anomalías histológicas en el esófago y el estómago, pero a diferencia de los humanos, no se ha registrado megaesófago ni megacolon <sup>(57)</sup>.

##### 5.5.2.2.1. Forma aguda

En perros, después de la infección, los tripomastigotes entran a las células (macrófagos), permitiéndoles evadir la respuesta inmune y propagarse por todo el cuerpo. La parasitemia aparece tres días post-infección, se eleva de manera constante con un pico a los 17 días y alrededor de 14 días se presentan los signos clínicos de la miocarditis

aguda, se piensa que esto se debe al daño celular y la inflamación resultante por la ruptura de miocitos mediada por los tripomastigotes <sup>(26), (57)</sup>.

En cachorros encontramos: letargo, linfadenopatía generalizada, tiempo de llenado capilar lento con las membranas mucosas pálidas, pelaje descuidado, diarrea, ascitis o pérdida de peso y a veces hepatoesplenomegalia. En perros mayores de 6 meses, los signos son menos graves y a veces no es evidente <sup>(26), (57)</sup>. Los chagomas son poco frecuentes, pero se han registrado en algunos perros inoculados con una cepa sudamericana de *T. cruzi*<sup>(57)</sup>.

#### 5.5.2.2.2. Fase indeterminada o latente

En esta fase resulta difícil encontrar los parásitos, y el animal es asintomático; puede tener una breve duración de 27 días en algunos animales infectados experimentalmente, pero parece durar años en algunas infecciones naturales <sup>(57)</sup>.

#### 5.5.2.2.3. Fase crónica

Se da durante los próximos 8 a 36 meses con una dilatación cardíaca, esto genera alteraciones al ecocardiograma (ECG) e incluso provoca la muerte súbita. Los signos clínicos pueden ser congestión venosa derecha, déficit del pulso, ascitis, derrame pleural, hepatomegalia, anorexia, letargo, edema, diarrea, vómito, cardiomegalia y dificultades respiratorias <sup>(26), (57)</sup>.

### 5.5.3. Humano

La infección humana es el resultado de la acción directa del hombre sobre la naturaleza, que se produce cuando las personas invaden el ciclo enzoótico de *T. cruzi* <sup>(101)</sup>. Es posible infectarse por varios mecanismos, de los cuales el principal y de mayor importancia epidemiológica es la transmisión a través de las deyecciones de triatomíneos parasitados. Este es el mecanismo natural, causante de la llamada "infección adquirida" <sup>(58)</sup>.

#### 5.5.3.1. Periodo de incubación

La incubación por transmisión vectorial se produce en un lapso de 4 a 15 días <sup>(19),(52), (57), (58), (118)</sup>, luego de esto se presentan las manifestaciones de la fase aguda. La forma infectante del *T. cruzi* por esta vía de transmisión es el tripomastigote metacíclico. En la

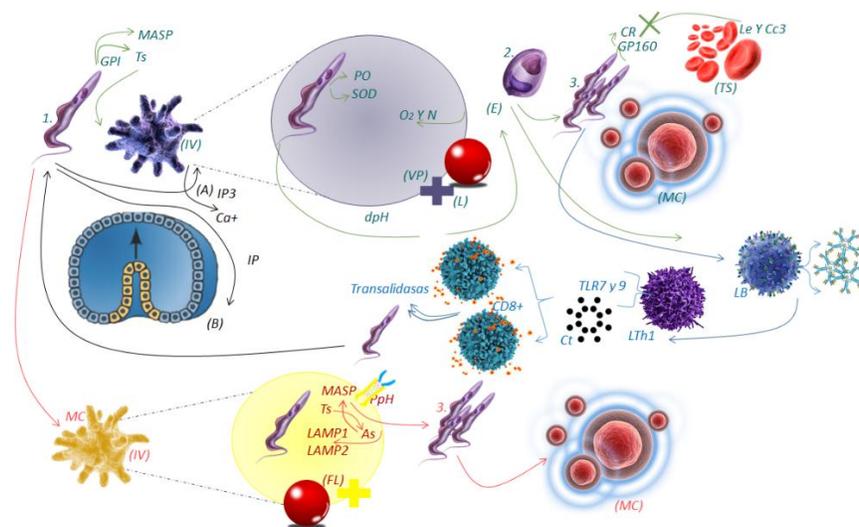
transmisión por transfusión sanguínea, la incubación varía de tres semanas a tres meses y la forma infectante del parásito es el tripomastigote sanguíneo. Cerca del 30% al 40% de las personas infectadas, desarrollan la fase crónica de la enfermedad luego de un período asintomático que puede durar de 5 a 40 años <sup>(19), (34), (57)</sup>.

### 5.5.3.2. Fisiopatología

Entre los síntomas más representativos encontramos: anemia profunda con gran deterioro de órganos, edema limitado o generalizado, aumento de los ganglios cervicales, axiales, inguinales y esternocleido-mastoideo, fiebre, edema bilateral del párpado, erupción cutánea maculopapular, hepatomegalia, esplenomegalia y linfocitosis relativa y absoluta <sup>(25), (34), (84), (110)</sup>.

#### 5.5.3.2.1. Aspectos inmunológicos

La infección por *T. cruzi* induce una fuerte inmunidad humoral mediada por anticuerpos IgM e IgG y participación del complemento <sup>(13), (59), (132)</sup>. La principal afección visceral es la cardíaca cuyos mecanismos no han sido completamente esclarecidos, pero su presentación puede estar relacionada con la misma actividad de linfocitos CD8 y varias citoquinas a nivel local <sup>(19)</sup>. Aunque la respuesta inmune, con el tiempo, se desarrolla a tal manera que sea capaz de reducir la parasitemia y el parasitismo en los tejidos, no es eficaz en la eliminación completa del parásito <sup>(133)</sup>. La persistencia del parásito es considerada causante de la infiltración linfocítica del miocardio, que lleva a la pérdida celular por fibrosis y apoptosis, lo que contribuye a la insuficiencia cardíaca <sup>(23), (118)</sup>.



**Figura 11.** Evasión de la respuesta inmune por *T. cruzi* en las diferentes fases de la enfermedad. Fuente:Elaboración propia, modificado de Cardoso, M; Reis-Cunha, J; Bartholomeu, D. 2016 <sup>(133)</sup>.

La evasión de la respuesta inmune por *T. cruzi* se encuentra dividida en las diferentes fases de la enfermedad (Fig. 11). Fase aguda: “convenciones verdes” El tripomastigote metacíclico (1) contiene una proteína de superficie llamada Glicosilfosfatidilinositol Polimórfico (GPI) donde se anclan proteínas como trans-sialidasas (Ts) y proteínas de superficies asociadas a mucinas (MASP), lo que le permite invadir las células (IV), formando una vacuola parasitófora (VP), la cual se fusiona con lisosomas (L). La supervivencia del parásito está mediada por enzimas antioxidantes, tales como peroxidasas (PO) y superóxido dismutasa (SOD); la disminución de pH (dpH) activa los mecanismos claves para que el parásito escape de la VP al citoplasma (E), donde se diferencia a amastigotes replicativos (2). Después de varias duplicaciones, los amastigotes (2) se diferencian en el estadio infectante, tripomastigotes sanguíneos (3), los cuales realizan la ruptura de la membrana celular e infecta nuevas células (MC) o ingresa en el torrente sanguíneo (TS), en el cual elude la lisis y la opsonización con proteínas como calreticulina (CR) y GP160, interrumpiendo la unión de las vías del complemento de Lectina (Le) y desarmando la convertasa C3 (Cc3), una de las vías más importantes del complemento <sup>(133)</sup>.

Fase inicial: “convenciones azules” el parásito provoca la activación de células B (LB) y una hipergammaglobulinemia (Acs) inespecífica, los cuales son ineficaces en el control de la infección, como consecuencia se produce la activación de receptores intracelulares tipo toll 7 y 9 (TLR 7 y TLR 9) de los linfocitos Th1 (LTh1) generando citoquinas proinflamatorias (Ct). Esta respuesta conduce a la producción de células CD8+ que se dirigen a epítopes inmunodominantes del parásito, derivados de la familia Ts; la respuesta controla la parasitemia y el parasitismo tisular, pero no desaparece la infección, llevando así a la fase crónica de la enfermedad de Chagas. El ingreso del parásito se puede dar por dos mecanismos: “convenciones negras” (A) La IV de células fagocíticas no profesionales a través de una ruta dependiente de L, que induce calcio (Ca+) a la señalización por trifosfato inositol (IP3), seguido por el reclutamiento y la fusión de los L; (B) invaginación de la membrana plasmática, seguido de la fusión intracelular con los lisosomas <sup>(133)</sup>.

Fase crónica: “convenciones rojas” La asociación entre el fagolisosoma (FL) y el tripomastigote (1) es desintegrada a través de la acción de una proteína formadora de poros dependiente de pH bajo (PpH). La superficie interna del fagolisosoma está recubierta con dos proteínas (LAMP 1 y 2) que tienen residuos de ácido siálico (As); cuando el medio del fagolisosoma es ácido, la Ts es activada, transfiriendo el ácido siálico a las MASP que lo protege de la lisis, produciendo la ruptura del fagolisosoma permitiendo MC <sup>(133)</sup>.

#### 5.5.3.2.2. Fases clínicas

La infección por *T. cruzi* en el humano se caracteriza por tres fases clínicas: 1) aguda, 2) indeterminada o asintomática y 3) crónica. Los períodos de incubación de la enfermedad son variables, dependen de la vía de transmisión y de las formas infectantes del parásito <sup>(19)</sup>.

##### 5.5.3.2.2.1. Fase aguda

Esta fase es poco frecuente y se observa más en niños que en adultos <sup>(13), (19)</sup>. Se caracteriza por fiebre vespertina de 38°C y después de dos a tres semanas, puede haber edema facial, de piernas y pies, anorexia, vómito, sudoración, diarrea, postración, dolor muscular, cefalea, hepatoesplenomegalia y linfadenopatía axilar e inguinal moderada <sup>(19)</sup> <sup>(58)</sup> <sup>(118)</sup> <sup>(57)</sup>, los casos agudos se recuperan antes de tres meses <sup>(13)</sup>, <sup>(134)</sup>.

Los síntomas expresados son moderados y atípicos, razón por la cual la enfermedad es reconocida solo entre el 1% y el 2% de los pacientes <sup>(19)</sup>. En esta fase, son abundantes los tripomastigotes en sangre y los amastigotes en tejido <sup>(52)</sup>, desaparece en cuatro a ocho semanas pasando a una fase asintomática o de aparente normalidad <sup>(19)</sup>, <sup>(22)</sup>, <sup>(84)</sup>.

Al crecer la parasitemia *T. cruzi* tiene predilección por el miocardio, músculo liso y la glía del sistema nervioso (SN). La miocarditis aguda se ha caracterizado por dilatación y flacidez. Microscópicamente hay edema, inflamación intersticial de células mononucleares y leucocitos polimorfonucleares; los amastigotes abundan dentro de las fibras cardíacas, con pérdida de su estriación. El proceso inflamatorio se extiende al sistema de conducción y a los ganglios parasimpáticos intracardiacos, pero también se han observado infiltrados mononucleares y destrucción neuronal del plexo mioentérico del tubo digestivo <sup>(13)</sup>, <sup>(34)</sup>, <sup>(86)</sup>.

##### 5.5.3.2.2.2. Fase latente o indeterminada

En este periodo la sintomatología se apaga, hay multiplicación lenta de los parásitos y presencia de anticuerpos circulantes específicos de la clase IgG. Esta fase puede durar toda la vida o pasar a la etapa crónica <sup>(13)</sup>. La serología es positiva y puede demostrarse parasitemia entre el 20% y el 60% de los casos <sup>(19)</sup>.

Las personas en esta fase constituyen un reservorio de la enfermedad <sup>(19)</sup> se encuentran aparentemente sanas, en las que la inoculación del parásito y los síntomas no son reconocidos por el portador, el cual puede ser asintomático toda la vida o presentar

manifestaciones clínicas después de muchos años de haberse infectado. Al igual que en la fase crónica son escasos los tripomastigotes en sangre y los amastigotes en tejido <sup>(52)</sup>, <sup>(58)</sup>.

#### 5.5.3.2.2.3. Fase crónica

El periodo crónico depende del tropismo de la cepa de *T. cruzi* <sup>(19)</sup> solo del 20% al 40% de los casos llegan a esta fase <sup>(27)</sup>; generalmente, se manifiesta diez o más años después de la primoinfección. El daño comienza por bloqueo completo de la rama derecha del haz de His <sup>(5)</sup>, extrasístoles ventriculares prematuras acompañadas de pulso lento <sup>(13)</sup>, <sup>(19)</sup>, <sup>(21)</sup>. Recientemente, se ha subdividido la etapa crónica de la enfermedad de Chagas en período crónico reciente, que estaría formado por individuos chagásicos menores de 12 años y en período crónico tardío <sup>(58)</sup>, <sup>(134)</sup>, <sup>(135)</sup>, <sup>(136)</sup>.

También se encuentran afectaciones en el colon, como lo es el megacolon <sup>(13)</sup>. Se puede presentar una dilatación patológica del esófago, como es el megaesófago, con presencia de disfagia, dolor epigástrico o retroesternal y regurgitaciones; en casos graves, es posible que existe pérdida de peso o caquexia y ruptura de esófago. Cuando esta afección se da en niños, suele provocar mal nutrición crónica y “enanismo chagásico” secundario <sup>(13)</sup>, <sup>(22)</sup>, <sup>(57)</sup>.

En esta fase son escasos los tripomastigotes en sangre y los amastigotes en tejido <sup>(52)</sup>. Microscópicamente, se ha observado destrucción y disminución de las fibras cardíacas y fibrosis intersticial, con liberación de antígenos intracelulares que suelen inducir la síntesis de autoanticuerpos contra el endocardio, los vasos sanguíneos y las fibras cardíacas. El sistema de conducción se encuentra alterado con infiltrado inflamatorio y presenta lisis del miocardio parasitado por los amastigotes <sup>(13)</sup>, <sup>(19)</sup>, <sup>(34)</sup>.

La fisiopatología crónica se entiende por tres hipótesis: la persistencia de los parásitos en el corazón, la respuesta autoinmune y el desequilibrio autonómico cardíaco <sup>(19)</sup>, <sup>(118)</sup>, <sup>(86)</sup>. En la actualidad el diagnóstico de enfermedad de Chagas en su fase crónica se establece por recomendación de la OMS por la presencia de los siguientes criterios clínicos, epidemiológicos y serológicos:

- Un síndrome clínico compatible con cardiopatía chagásica.
- Historia de residencia en área endémica para la enfermedad de Chagas.
- Dos prueba serológicas con diferente técnica, positivas para *T. cruzi* <sup>(19)</sup>.

#### 5.5.3.2.2.4. Forma congénita

Las mujeres infectadas con *T. cruzi* pueden dar a luz niños infectados durante cualquiera de los embarazos, independientemente de si es o no paciente sintomática <sup>(57)</sup>. Las infecciones congénitas ocurren en el 1% al 10% de los bebés nacidos de madres infectadas, y esto puede ocurrir en cualquier etapa de la enfermedad <sup>(19), (57)</sup>.

Se trata de niños (prematuros) que nacen infectados por pasaje del parásito a través de la placenta de la madre; generalmente presentan hepatoesplenomegalia con gran cantidad de tripomastigotes en sangre y amastigotes en tejidos <sup>(52)</sup>; como puede sospecharse la mayoría de las veces esta forma de la enfermedad es fatal <sup>(19), (57)</sup>.

### 5.6. Puerta de entrada

Los excrementos son el vehículo común de contaminación del mamífero ya que los tripanosomas pueden penetrar fácilmente las mucosas y la piel una vez que las barreras naturales han sido rotas por heridas, excoriaciones o abrasiones <sup>(5)</sup>. El acto reflejo de rascado lleva los parásitos, que están en las deposiciones (heces u orina del redúvido), hasta el punto de la lesión ocasionada por la picadura del insecto, mucosas u otras abrasiones de la piel <sup>(51), (57)</sup>. Al parecer el carácter irritativo de la saliva podría jugar un papel importante en el mecanismo de infección <sup>(5)</sup>.

#### 5.6.1. Chagoma

En las heces del insecto vector y a través de la piel lesionada, el parásito pasa los tripomastigotes metacíclicos. Éstos son fagocitados por los macrófagos multiplicándose en su citoplasma lo que genera la ruptura de su membrana y conlleva a una inflamación local o “Chagoma de inoculación”, caracterizada por una lesión de 3 cm de diámetro, levantada, eritematoedematosa y moderadamente dolorosa, con adenomegalia satélite regional <sup>(11), (13), (19), (23), (134)</sup>.

#### 5.6.2. Signo de Romaña

Cuando los tripomastigotes infectan la piel periorbitaria o la mucosa conjuntival, se produce el complejo oftalmoganglionar o signo de Romaña, caracterizado por edema periocular unilateral, bpalpebral, duro y de color violáceo (ojo en tinta), indoloro, que dificulta la apertura de los párpados y ocasiona secreción conjuntival escasa <sup>(13), (23), (52), (58), (134)</sup>.

Esta lesión es rara y se cura en aproximadamente cuatro semanas; la observación clínica de este signo ha permitido diagnosticar la puerta de entrada del parásito <sup>(13), (19), (57), (58)</sup>. La frecuencia de la 'señal ojo' o 'signo Romaña' parece variar en diferentes áreas geográficas, tal vez dependiendo de las especies de insectos que se sienten especialmente atraídos a la cara de la víctima por el aire y CO<sub>2</sub> exhalado durante la respiración <sup>(5)</sup>.

### 5.6.3. Otros

Otro tipo de adquisición de la enfermedad se debe sospechar cuando el paciente agudo no muestre la reacción inflamatoria típica del sitio inicial de la infección <sup>(43)</sup>, como el consumo de carne poco cocida de mamíferos infectados y los accidentes de laboratorio, principalmente por el manejo de agujas <sup>(22), (51)</sup>.

## 5.7. Mecanismos de transmisión

### 5.7.1. Transmisión Vectorial

La picadura del insecto vector es indolora y ocurre generalmente en la noche, la defecación se da una vez ingiere la sangre <sup>(19)</sup>. El ingreso de la forma infectiva (tripomastigote metacíclico) se produce por contacto de piel abierta o mucosas con las heces de los triatominos infectados. Generalmente ocurre en forma mecánica al rascarse después de la picadura del insecto <sup>(23), (52), (131)</sup>.

La eficacia de un insecto como vector se mide de acuerdo al tiempo entre la ingestión sanguínea y la defecación, no todos los triatominos defecan durante o inmediatamente después de la alimentación <sup>(5), (57)</sup>. Las especies de insectos triatominos que muestran defecación tardía luego de alimentarse tienen menos probabilidades de transmitir la enfermedad de Chagas, que las especies que defecan sobre el huésped <sup>(22), (57), (134)</sup>.

### 5.7.2. Transmisión oral

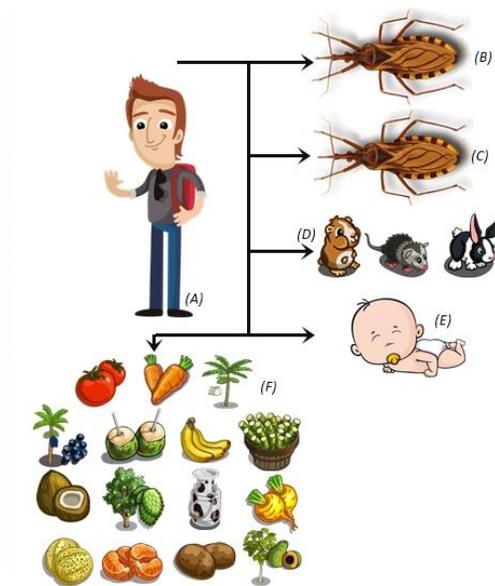
La infección por *T. cruzi* en humanos reemerge como una enfermedad transmitida por alimentos en áreas donde previamente no era endémica <sup>(41)</sup>. Hábitos como el consumo de triatominos son comunes entre los gatos, armadillos, perros, ratas y zarigüeyas; sin embargo, se ha visto, que algunos animales al lamerse el pelaje se pueden contaminar con las heces de insectos depositados allí, sin necesidad de ingerir el triatomino <sup>(5)</sup>; insectos que invaden los hogares cuando son atraídos por la luz <sup>(9),(57)</sup>, el calor o determinados olores, pueden contaminar los alimentos o es posible la contaminación

por el contacto de heces de triatomino, al ser triturado con la preparación de los alimentos (22), (23), (35) (134).

La infección oral es más probable cuando se ingiere alimentos crudos o alimentos ya cocinados que se hayan calentado <sup>(110)</sup>. En estos casos la enfermedad es más grave y aguda, el principal síntoma es una miocarditis aguda, que no se observa en la fase primaria o aguda de la transmisión vectorial, por lo cual recibe la denominación enfermedad de Chagas hiperaguda; fatal en la mayoría de los casos <sup>(15), (74)</sup>.

La infectividad de formas metacíclicas de heces de insectos fue demostrada por Kofoid y Donat (1933) y Cardoso (1938) mediante la infección experimental con tripomastigotes metacíclicos con heces de insectos reducidos por vía bucal y mucosa <sup>(110)</sup>. En lugares donde no hay presencia de vectores cerca y los pacientes no presentan lesiones de infección primaria, la transmisión se puede dar a través de alimentos contaminados por heces u orina de *Didelphis spp.* <sup>(6), (47)</sup>.

La sospecha de transmisión oral se da en tres casos 1) presencia simultánea de 2 o más casos agudos, con nexo epidemiológico entre ellos, 2) presencia de cuadro clínico severo y 3) ausencia de triatominos domiciliados o alrededor del área de ocurrencia <sup>(39)</sup>.



**Figura 12.** Vías de contagio de la enfermedad de Chagas por vía oral. (A) Humano: huésped susceptible a la infección por *T. cruzi* <sup>(74)</sup>, (B) Consumo accidental del insecto vector <sup>(33), (74)</sup>, (C) consumo accidental de deyecciones del insecto vector <sup>(51), (74)</sup>, (D) ingestión de animales de caza infectados de izquierda a derecha: cobayo, zarigüeya y conejo <sup>(12), (74), (125), (102), (128)</sup>, (E) lactancia materna <sup>(5), (6), (19), (74)</sup>, (F) Alimentos contaminados con deposiciones de marsupiales portadores de *T. cruzi* (Alimentos han demostrado mantener la vida útil del parásito) de izquierda a derecha y de arriba abajo: tomate, zanahoria, vino de palma, acaí, agua de coco, banano, caña de azúcar, coco, guanábana, leche, maca, melón, mandarina, papa y papaya. Fuente: Elaboración propia, modificada de Toso, A; Vial, F; Galanti, N. 2011 <sup>(6), (15), (18), (22), (30), (33), (110), (35), (36), (41), (74)</sup>.

### 5.7.3. Transmisión transfusional

Vía sanguínea se comprobó que los tripanosomas pueden sobrevivir hasta dos meses en sangre refrigerada <sup>(19)</sup> lo que se considera un factor de riesgo para los países que aún no cuentan con el tamizaje obligatorio en los bancos de sangre para sus donantes <sup>(5), (22), (23), (134)</sup>.

### 5.7.4. Transmisión transplacentaria

La transmisión vía transplacentaria se puede presentar en un 30% desde el cuarto al noveno mes o durante el parto <sup>(19), (23), (39)</sup> y se ha demostrado la capacidad de tripanosoma para producir daños al feto y la placenta, causando placentitis y endometritis chagásica, aunque Carlos Chagas fue el primero en sospecharlo en 1916 <sup>(5)</sup>. La transmisión vertical con animales salvajes y domésticos permite el mantenimiento del ciclo, incluso cuando la actividad del vector es baja <sup>(22), (23), (134), (137)</sup>.

### 5.7.5. Transmisión por trasplante

Los receptores de trasplantes pueden recibir órganos de donantes infectados con *T. cruzi* por lo cual deben recibir tratamiento específico y seguimiento durante todo el tiempo de inmunosupresión al que se ven sometidos <sup>(22), (23), (83), (134), (136), (138)</sup>.

### 5.7.6. Transmisión por lactancia materna

La posible contaminación humana por lactancia materna fue reportada por Mazza (1936) y por Medina-Lopes (1988) <sup>(110)</sup> y otros estudios reportaron este tipo de infección en cachorros <sup>(5), (22), (23), (137)</sup>.

### 5.7.7. Transmisión sexual

Mckeever y Olsen en 1958 y 1964 aislaron *T. cruzi* de la orina de *D. marsupialis*, lo que sugiere que la transmisión entre animales de la misma especie podría efectuarse a través de la orina o durante el apareamiento, ya que también se ha encontrado a *T. cruzi* en los testículos y semen de cobayos y ratones infectados con amastigotes en los tubos de esperma <sup>(5), (6), (22), (23), (134)</sup>.

## 5.8. Factores de riesgo y determinantes de la salud

El principal condicionante de la infección del humano está constituido por una vivienda apropiada para la reproducción del vector <sup>(19)</sup>. El tipo de construcción, no impacta el riesgo de infestación ni colonización, pero si lo hace la higiene; por lo tanto, a menor higiene, mayor infestación y colonización <sup>(7)</sup>. Los brotes de esta enfermedad están influenciados por factores tales como la presencia de portadores, reservorios salvajes, concentración de los animales infectados por vectores, la reproducción de los insectos y las características medioambientales <sup>(23), (61)</sup>.

En la medida en que el hombre fue entrando en contacto con los focos naturales y provocó desequilibrios ecológicos, forzó a los triatomíneos silvestres infectados a ocupar viviendas humanas, llevándose a cabo el proceso de domiciliación, ya que allí no solamente encuentran refugio, sino también suficiente alimento en la sangre humana y de animales domésticos. De esta manera, el hombre entra a formar parte activa de la cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas <sup>(67)</sup>.

Su introducción en estos nidos, no elimina el insecto ni el microorganismo, sino, que desplaza los hospederos naturales, sustituyéndolos por mamíferos domésticos que adquieren la parasitosis y crean un ciclo peridoméstico transformándola de una nididad natural silvestre a una doméstica <sup>(7), (102)</sup>. El mayor riesgo para la transmisión se produce durante las actividades al aire libre (caza, camping) como resultado de la interrupción de la transmisión del ciclo silvestre y peridoméstico. Por lo tanto las actividades que requieren un contacto frecuente con los animales domésticos y salvajes, podrían elevar el riesgo de infecciones humanas <sup>(67), (103)</sup>.

El vuelo dispersivo, es una de las principales razones de la expansión de la infección, ya que el insecto abandona su hábitat y va en busca de alimento en zonas rurales o urbanas. La presencia del triatómino en áreas urbanas aumenta en la medida en que el hombre entra en contacto con focos naturales y provoca un desequilibrio ecológico, forzando a los triatóminos silvestres infectados a ocupar viviendas humanas <sup>(139)</sup>. Los factores epidemiológicos importantes que influyen en la adaptación y la propagación de estos insectos en las viviendas humanas son los siguientes:

- Factores entomológicos: adaptabilidad fisiológica, eclecticismo alimentario, agresividad natural, la duración del ciclo de vida, potencial biótico y mecanismos de protección <sup>(5)</sup>.
- Factores antropocéntricos y ambientales: las condiciones sanitarias en casas, tipo de construcción, nivel educativo de los habitantes, condiciones climáticas, enemigos naturales y competidores <sup>(5)</sup>.

La enfermedad de Chagas representa una amenaza significativa tanto en zonas endémicas como no endémicas, debido a la constante migración y viajes turísticos que hay en Colombia. En nuestro país la transmisión oral y su asociación a formas agudas, se ha hecho relevante debido a que conlleva a consecuencias fatales para la vida humana <sup>(59)</sup>.

En zonas rurales es fácil el contacto con el parásito por la presencia domiciliaria del vector o la infección de animales domésticos que infectan focos selváticos <sup>(19)</sup>. Las estaciones secas y prolongadas con temperaturas altas, aumentan la probabilidad de encontrar más vectores <sup>(140)</sup>. Parásitos, vectores y huéspedes, forman parte de una red trófica que puede ser modificada por los cambios climáticos o los impactos antropogénicos <sup>(71)</sup>.

Entre las principales dificultades del país encontramos: difícil acceso al diagnóstico, deficiente calidad y cobertura de la fase crónica, tanto en el manejo etiológico como en la cardiopatía <sup>(39)</sup>. Consecuencias como la muerte temprana de poblaciones adultas, lo que genera pérdidas de productividad de la comunidad, debido a los altos costos médico-sociales, representados por tratamientos, hospitalizaciones, uso de marcapasos, entre otros <sup>(61)</sup>.

## 5.9. Diagnóstico

Los criterios diagnósticos internacionalmente aceptados por la OMS, implican dos pruebas positivas con diferente principio, con la finalidad de tener un alto grado de confiabilidad sugiriéndose una tercera prueba en caso de discrepancia entre ellas <sup>(3),(19), (58), (141)</sup>.

**Tabla 2.** Utilidad de las pruebas de diagnóstico en las formas clínicas. Convenciones - No útil, +/- utilidad relativa, + útil, Ac anticuerpos. Fuente: Elaboración propia, Modificado de Vega, S; Náquira, C. 2005 <sup>(52)</sup>.

Técnicas de diagnóstico	Formas clínicas de la enfermedad de Chagas		
	Aguda	Crónica	Congénita
Examen en fresco	+	-	+
Hemocultivo	+++	+/-	+++
Xenodiagnóstico	+++	+	+++
PCR	++++	++	++++
Pruebas serológicas (HAI, IFI, ELISA)	- Al inicio +++ Después de 20 días	+++	IgG +: Ac de la madre IgM +: Ac del recién nacido hasta los seis meses

### 5.9.1. Pruebas parasitológicas directas

Estas técnicas están indicadas para cuando existe sospecha clínica o epidemiológica de la forma aguda y para investigación de Chagas congénita. Se realiza durante las dos a ocho primeras semanas después de ocurrida la infección, ya que en estas existe un gran número de tripomastigotes que circulan en el torrente sanguíneo. Un resultado positivo de alguna de estas técnicas confirma la infección, pero el resultado negativo no la descarta <sup>(19), (23), (52), (58)</sup>.

#### 5.9.1.1. Examen en fresco

El método estándar de laboratorio para el diagnóstico de la tripanosomiasis es demostrar e identificar tripanosomas en la sangre del animal infectado <sup>(88)</sup>. Se examina directamente con el microscopio una gota de la muestra con sospecha de infección. Esta prueba es: sencilla, rápida y económica, permite demostrar la presencia del parásito en la forma aguda o congénita siendo útil cuando la parasitemia es elevada <sup>(19),(52), (141)</sup>.

El examen en fresco presenta una sensibilidad menor al 50 % para un solo examen, lo que implica que para aumentar su sensibilidad se debe repetir varias veces <sup>(11)</sup>. Su objetivo es la búsqueda de formas móviles (tripomastigotes) del parásito. Si el resultado es negativo, se debe repetir el examen día de por medio por lo menos durante una semana <sup>(23), (52), (132)</sup>.

#### 5.9.1.2. Extendido coloreado

La sangre del paciente es examinada mediante la tinción con el método Giemsa o Wright <sup>(13), (25), (47), (50), (57)</sup>, con el objetivo de teñir las formas parasitarias (tripomastigotes sanguíneos) <sup>(19), (27), (132)</sup>.

#### 5.9.1.3. Biopsia

Es una técnica limitada a casos especiales de estudio y permite la observación de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina en donde se observan nidos de amastigotes <sup>(13), (52), (132)</sup>, son poco utilizadas en la rutina por ser un método invasivo <sup>(3), (23)</sup>.

#### 5.9.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica parasitológica, debido a que amplifica fragmentos de ADN del parásito y mediante hibridación con cebadores (fragmentos de ADN) conocidos de *T. cruzi*<sup>(52), (58)</sup>, permitiendo el diagnóstico de la infección más temprana que otros métodos parasitológicos; sin embargo, su uso en el diagnóstico clínico requiere la estandarización y validación de los protocolos en cada laboratorio<sup>(3), (34)</sup>.

Los métodos de biología molecular se caracterizan por ser específicos y poseer elevada sensibilidad, ya que detectan el ADN del parásito, aunque exista una cantidad pequeña de estos en la circulación sanguínea. Las pruebas de PCR utilizan cebadores para delimitar la amplificación de un segmento determinado del ADN utilizando un ADN polimerasa termorresistente. El resultado de la prueba es la amplificación de un fragmento de ADN específico, de tamaño conocido, detectado a través de la electroforesis en geles de agarosa, donde es visualizado como una banda, mediante la fluorescencia de una luz UV luego del tratamiento del gel con compuestos fluorescentes intercaladores de ADN, seguido por un registro fotográfico<sup>(3)</sup>.

Desde hace algunos años, la técnica de PCR ha sido introducida no solamente para reconocer la presencia de *T. cruzi* en diversos hospederos vertebrados, sino también caracterizar las cepas circulantes<sup>(58)</sup>. Entre las dianas más utilizadas se encuentran el minicírculo de kADN y la secuencia repetida de ADN satélite<sup>(51)</sup> representadas aproximadamente en un número de  $10^4$  copias, con una especificidad de un solo parásito por mililitro de muestra e incluso cantidades inferiores<sup>(132), (142)</sup>.

El ADN nuclear y la región variable del minicírculo del cinetoplasto de *T. cruzi* contienen varias secuencias repetitivas que son de mucha utilidad como blanco para la técnica de PCR, son abundantes y fáciles de purificar desde la célula tripanosómica<sup>(58)</sup>. Se usan además los genes del miniexón, los genes del ARNr y los espaciadores intergénicos (ITS)<sup>(51)</sup>.



Diana	Iniciación	Tamaño del amplificado	Ref.
ADN satélite	Tcz1, Tcz2	195 pb	23
	Diaz1, Diaz2	195 pb	41
Familia E113	O1, O2	220 pb	43
Sec. rep. moderada	C6s–C6r	344 pb	47
ADN telomérico	T189Fw2, Tc189Rv3	189 pb	34
24S alfa-rARN	D71, D72	110, 125 pb	50
18 SSU-rARN	V1, V2	165, 175 pb	49
ITS	ITS1, ITS2	1,2; 1,7; 1,2-1,4 kb	51
Minixón	TC, TC1, TC2	300; 350 pb	6
	TCC, TC1, TC2, TC2'	300; 350; 250 pb	53
Proteína flagelar	BP1-BP2	692 pb	44
ORF proteína flagelar	FPS	177 pb	42
Proteína Tc24	T1, T2	636 pb	45
Minicirculo	S35-S36	330 pb	32
	S34, S67, S35, S36	83; 123; 330 pb	48
	121-122	330 pb	46

**Figura 13.** Dianas de diagnóstico y caracterización molecular de *T. cruzi*. SSU-rRNA: gen del ARN ribosomal de la subunidad pequeña del ribosoma; ITS: espaciadores intergénicos del gen del ARN ribosomal; N: núcleo; K: kinetoplasto. Tomado de Chávez, M; Fuentes, I; Gárate, T; Cañavate, C. 2006 <sup>(51)</sup>.

### 5.9.2. Pruebas parasitológicas indirectas

Estos métodos tienen por objeto multiplicar los parásitos en el laboratorio a partir de diferentes muestras del paciente, son más sensibles que los métodos directos; sin embargo, su inconveniente es que los resultados pueden demorarse varias semanas. Se utilizan más en la fase crónica cuando la parasitemia es baja o en investigación <sup>(19), (23)</sup>.

#### 5.9.2.1. Xenodiagnóstico

Es un procedimiento sofisticado desarrollado por Brumpt en 1914 <sup>(58)</sup>, el cual consiste en permitir la transmisión a una ninfa en quinto estadio (sin infección) caracterizada por tener unas semanas de ayuno <sup>(19)</sup>; estas se alimentan de un posible portador y determinan la infección mediante su alimentación hasta la saciedad. Esta técnica es aplicable en la forma aguda, crónica e indeterminada <sup>(52),(143)</sup>. Tiene una sensibilidad de 85% en las formas agudas, 80% en las congénitas y 49% en las crónicas <sup>(19), (23)</sup>.

El tiempo de aplicación del triatomino para el xenodiagnóstico debe ser suficiente para que los insectos se llenen por completo, varios triatominos pueden durar de 15 a 30 minutos; en lo posible se debe prolongar el contacto cuando se observa que el insecto no se encuentra lo suficientemente lleno, es decir, cuando mayor sea el grado de llenado mejor será el resultado <sup>(58), (143)</sup>.

El triatomino debe ser observado a los 30, 60, 90 hasta 120 días <sup>(19), (58)</sup>, no es recomendable un intervalo excesivamente largo ya que con el tiempo la infección puede desaparecer espontáneamente <sup>(143)</sup>. Entre las características esenciales que debe tener un triatomino para ser usado en xenodiagnóstico están:

- Alimentación en condiciones de laboratorio.
- No permitir triatominos que han estado en contacto con personas o animales.
- No introducir crías de diferente procedencia.
- Controlar periódicamente su contenido intestinal <sup>(143)</sup>.

#### 5.9.2.2. Cultivo

*T. cruzi* se puede cultivar a partir de tejidos, muestras de sangre heparinizadas, sedimento, después de la remoción del plasma de sangre desfibrinada, macerado de tejidos o líquido cefalorraquídeo (LCR) con la finalidad de amplificar el número de parásitos presentes y confirmar el diagnóstico <sup>(57), (112)</sup>. Tiene una sensibilidad alta en los casos agudos y congénitos. La limitación de la prueba se encuentra en el tiempo prolongado de incubación que se requiere (desde uno a seis meses) para emitir el informe del resultado <sup>(52), (57)</sup>. Este método alcanza una positividad de 55% en pacientes en fase crónica <sup>(19), (23)</sup>.

Se emplean medios como LIT (liver- infusion-tryptosa) ó NNN (Novy-McNeal-Nicolle) además de las líneas celulares Vero <sup>(57)</sup>. Algunos medios tienen ventajas para el aislamiento inicial y otros para el mantenimiento posterior <sup>(19)</sup>.

#### 5.9.2.3. Inoculaciones en animales

Se emplean ratones o cobayos procedentes de colonias protegidas de infecciones naturales por *T. cruzi* y se realiza una inoculación intraperitoneal, subcutánea o en la conjuntiva de sangre venosa citratada o del material procedente del xenodiagnóstico (deyecciones o macerado de insecto). Entre el día quinto y hasta la sexta semana posterior a la inoculación, se evalúa la parasitemia mediante exámenes en fresco y coloreados. Se emplea fundamentalmente para evaluar la infectividad de las cepas <sup>(19), (23), (112)</sup>.

### 5.9.3. Pruebas serológicas

Estas pruebas tienen como objetivo la detección de anticuerpos contra *T. cruzi*. Son de gran aplicación en la forma crónica e indeterminada, es decir, cuando la parasitemia es baja o nula <sup>(52), (58)</sup>; sin embargo, pueden generar reacciones cruzadas con parásitos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, como *T. rangeli* (no patógeno) y *Leishmania spp* <sup>(3), (23), (144)</sup>.

Las muestras empleadas pueden ser: sangre capilar, sangre venosa total y suero sanguíneo <sup>(52)</sup>. Se hacen positivas 5 a 15 días después de haber aparecido los síntomas. Las más utilizadas son la hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayo por inmovinabsorción ligado a enzimas (ELISA) <sup>(13), (57)</sup>. Son rápidos ya que requieren solo 10 a 15 minutos para obtener resultados <sup>(51)</sup>; sin embargo, se ha detectado que existe una gran cantidad de pacientes que no generan anticuerpos detectables, los llamados no respondedores <sup>(3), (34), (141)</sup>.

Los anticuerpos se mantienen elevados aunque la infección haya sido curada <sup>(3)</sup>. La preparación de antígenos para estos procedimientos se hace con parásitos completos, fracciones antigénicas, anticuerpos monoclonales y antígenos específicos purificados, con el fin de evitar las reacciones cruzadas con *T. rangeli* <sup>(19)</sup> debido a que comparten antígenos solubles <sup>(145)</sup>.

#### 5.9.3.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Es un procedimiento inmunológico que detecta tanto IgG como IgM <sup>(19)</sup>. Emplea como antígeno epimastigotes de *T. cruzi*, obtenidos de cultivo y fijados en láminas sobre las que se realiza la reacción antígeno-anticuerpo, evidenciada por una antiglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína o tetrametil rodamina <sup>(19)</sup>. Los kits comerciales proporcionan la lámina preparada y los reactivos <sup>(52)</sup>.

Es una prueba altamente sensible y específica <sup>(52)</sup>. Las muestras se consideran positivas si se observa reactividad con títulos iguales o superiores a 1:32. Puede dar lugar a reacciones cruzadas con otros parásitos en especial los del género *Leishmania*, evidenciada especialmente en títulos bajos de anticuerpos <sup>(19), (23)</sup>.

### 5.9.3.2. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Es una herramienta diagnóstica que mediante la unión covalente de enzimas a moléculas de anticuerpos permite la detección de anticuerpos de tipo IgM o IgG <sup>(19)</sup>. Emplea antígenos solubles de *T. cruzi*, adheridos a una placa de microtitulación y antiglobulinas humanas conjugadas con enzimas como detectores de la reacción antígeno-anticuerpo. Posee gran sensibilidad y su especificidad está sujeta a la calidad de los antígenos y reactivos empleados. La reacción suele hacerse positiva después de 20 días de infección <sup>(19), (23), (52)</sup>.

### 5.9.3.3. Hemaglutinación indirecta (HAI)

La hemaglutinación indirecta (HAI) o hemaglutinación reserva pasiva, se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos (que en este caso son anti *T. cruzi*) de producir aglutinación específica en algunos glóbulos rojos previamente sensibilizados con ácido tánico como soporte de extractos solubles del parásito (antígeno) detectando anticuerpos dirigidos contra los antígenos de superficie del protozoo, esta prueba es altamente sensible y específica <sup>(23), (52), (146)</sup>.

Sus diferentes interpretaciones son:

- No reactivo: presencia de un sedimento en forma de botón, o pequeño anillo de bordes regulares.
- Reactivo: formación de una película o manto que cubre el 50% más del fondo de los pocillos <sup>(147)</sup>.

### 5.9.3.4. Métodos de transferencia a filtros

La transferencia de proteínas o “blotting” emplea la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas, seguido de la detección con sistemas especialmente diseñados para la tinción de “blots”. El método más potente es el denominado Western blot en el que las proteínas son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular del gel a una membrana. El procedimiento es análogo al desarrollado por el profesor E. Southern (Southern blotting) y por ello se le denominó Western <sup>(19), (34)</sup>.

## 5.10. Tratamiento

Muchas son las drogas que han demostrado acción *in vitro* e *in vivo* sobre *T. cruzi*, pero las únicas que se pueden aplicar al hombre de acuerdo a normas éticas y clínicas son Benznidazol (BNZ), que actúa sobre la cadena respiratoria de *T. cruzi* y Nifurtimox (NFX), que actúa mediante la generación de radicales libres y metabolitos reactivos<sup>(58)</sup>. BNZ es el fármaco de elección para el tratamiento por su corta duración y menores efectos colaterales<sup>(22), (23), (35), (118)</sup>.

La quimioterapia específica para la enfermedad de Chagas es de reciente aplicación. Al respecto, muchas son las investigaciones que se han realizado para encontrar drogas apropiadas que muestren por una parte, alta actividad tripanocida y muy baja o nula toxicidad para el hospedero<sup>(34), (118)</sup>.

De acuerdo a la OMS, la droga ideal debe cumplir con los siguientes requisitos: lograr cura parasitológica de casos agudos y crónicos, ser eficaz en pocas dosis, ser accesible a los pacientes, carecer de efectos colaterales y teratogenicidad, no requerir hospitalización y no causar resistencia parasitaria. Actualmente, el tratamiento quimioterapéutico de la enfermedad de Chagas se recomienda en individuos que cursan con fase aguda, infección transplacentaria, fase crónica reciente y fase indeterminada<sup>(118)</sup>. Por el contrario, el tratamiento no es recomendado en pacientes crónicos con insuficiencia cardiaca terminal<sup>(58)</sup>.

En la fase aguda y crónica reciente, el seguimiento post-terapia se realiza principalmente a través de evaluación clínica, parasitológica y serológica. Se sugieren como criterios de curación en la enfermedad de Chagas crónica la negativización post-terapéutica de dos o más parámetros tales como xenodiagnóstico, PCR, hemocultivo, anticuerpos líticos, mejoría de la condición clínica y reversión de las alteraciones electrocardiográficas<sup>(58)</sup>. Es importante resaltar que el tratamiento elimina el parásito, pero no restablece el daño instaurado en el corazón<sup>(18)</sup>.

## 5.11. Prevención

Desde 1991, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la OMS han dirigido un programa conjunto para eliminar *T. infestans*, el vector más importante de la enfermedad de Chagas en humanos, lo que disminuye la distribución de este insecto en más de un 80% aunque aún se pueden encontrar focos en algunas regiones<sup>(57)</sup>.

Desde 1998 a 2000 el Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas y la Cardiopatía Infantil realizó una actualización de los vectores de *T. cruzi*, estudiando los departamentos de Antioquia, Córdoba, Bolívar, Cundinamarca, Boyacá, Casanare, Santander, Norte de Santander, Arauca, Meta, Tolima, Magdalena, Sucre, Cesar y La Guajira; mediante encuestas que destacaron la mayor distribución de *P. geniculatus* y *R. prolixus*<sup>(68)</sup>, cubriendo así el 45% de área endémica del país<sup>(63)</sup>.

La iniciativa de los países andinos ha generado al mismo tiempo la necesidad de investigación sobre distribución, dinámica y estructura genética de poblaciones no domiciliaria de triatomíneos. El estudio de la interacción entre las poblaciones de vectores selváticos, peridomésticos y domésticos es esencial para recoger suficientes datos entomológicos que permitan formular programas y estrategias de control. Además, se observó que, a pesar de fumigar, las especies transmisoras vuelven a aparecer, pues no se conoce el lugar exacto en donde colonizaron para atacar a los vectores de raíz<sup>(63)</sup>.

En Colombia las medidas de control de vectores sobre la enfermedad de Chagas aun no plantean acciones sobre los reservorios<sup>(11),(44)</sup>. Si se tiene en cuenta que el principal mecanismo de transmisión de la enfermedad de Chagas es a través del contacto del hombre y los animales reservorios con los insectos vectores, el conocimiento de la distribución de los triatomíneos es de gran importancia para poder encaminar de manera adecuada las medidas de control y prevención<sup>(67)</sup>. Es importante reconocer que cada ecótopo debe considerarse como un sistema único por cada programa que incluye la gestión del medio ambiente silvestre<sup>(109)</sup>.

Es de gran importancia hacer una previa educación a los habitantes sobre el conocimiento de la enfermedad y del vector, el correcto manejo de la higiene doméstica y el tiempo de defecación de este; ya que aumenta o disminuye la capacidad de transmisión vectorial<sup>(7)</sup>.

En áreas endémicas, las casas se pueden mejorar con la aplicación de revoque a las paredes, mejoramiento de los pisos y la toma de medidas para eliminar las grietas en las que se esconden los insectos; es más seguro dormir dentro de un área protegida, bajo un tul para cama impregnado en permetrina o en una habitación con aire acondicionado. Los tules para cama se deben sujetar debajo del colchón antes del anochecer. Los corrales de los animales y las áreas de almacenamiento se deben mantener alejados de los hogares, con el rocío de insecticidas regularmente dentro y alrededor de las casas para reducir la cantidad de insectos y, en algunos casos, eliminarlos<sup>(57)</sup>.

Las estrategias de control de la enfermedad de Chagas incluyen la interrupción de la transmisión vectorial, la tamización sistemática de la sangre de donantes en todos los

países endémicos, la detección y tratamiento de la transmisión congénita y la administración de tratamiento a los casos agudos y a los niños <sup>(148)</sup>.

Epidemiológicamente es importante realizar reporte de los casos nuevos semanalmente, tamización a niños menores de 18 años, notificación de casos confirmados, hemovigilancia en bancos de sangre y donadores de órganos <sup>(39)</sup> para evitar la transmisión a través de estas vías. Las personas que se encuentran en grupos de riesgo laboral deben tomar precauciones adicionales, los veterinarios y técnicos veterinarios tienen la responsabilidad de protegerse la piel y las membranas mucosas de la posible contaminación con parásitos en la sangre o los tejidos <sup>(57)</sup>.

La prevención de la infección canina con *T. cruzi* depende en gran medida el control de vectores, las estrategias de gestión integrada de plagas se pueden fundamentar en el uso de pesticidas, métodos de barrera (red o malla alrededor de las perreras) y la gestión física de los perros (a las instalaciones interiores en la noche en movimiento). Se considera que excluir de las habitaciones animales domésticos, puede reducir de manera importante la transmisión a los humanos <sup>(45)</sup>.

Para prevenir la presentación de la enfermedad en perros, estos no deben ser alimentados con carnes de reservorios silvestres como mapaches, zarigüeyas, armadillos y mofetas. La vivienda del perro se debe limpiar constantemente para eliminar los sitios de anidación del vector. Cuando los perros son utilizados como donantes de sangre deben ser examinados serológicamente para determinar la exposición anterior a *T. cruzi* <sup>(26)</sup>; el uso de vacunas contra *T. rangeli*, ha mostrado una disminución en la capacidad de infección del parásito <sup>(44)</sup>.

La transmisión oral se considera como una forma de transmisión reemergente, por ello se ha cambiado el panorama y es necesario implementar medidas de vigilancia <sup>(35)</sup>. Si se produce una exposición accidental, se debe desinfectar el lugar de inmediato de ser posible, y se pueden administrar fármacos antiparasitarios como medida profiláctica. Las personas que viajan a zonas donde la enfermedad de Chagas es frecuente, en lo posible deben usar vestimenta gruesa que cubra la mayor parte del cuerpo; se debe evitar dormir en viviendas precarias <sup>(57)</sup>. Se ha observado también que factores como el etanol, el hipoclorito de sodio y la luz UV, entre otros, eliminan al *T. cruzi* <sup>(74)</sup>.

Factores como: la distribución geográfica, densidad de población doméstica y peridoméstica, preferencia alimenticia, frecuencia de la alimentación, susceptibilidad a la infección y capacidad para producir tripomastigotes metacíclicos; deben ser tomados para la implementación de programas de control y vigilancia epidemiológica en la transmisión de la enfermedad de Chagas <sup>(63)</sup>.

## **6. HIPÓTESIS**

La Mesa (Cundinamarca), cuenta con diferentes grupos genéticos de *T. cruzi* (DTUs) asociados a los diferentes ciclos de transmisión.

## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1. Enfoque metodológico, tipo y diseño de la investigación**

El presente estudio tiene un enfoque metodológico cuantitativo, es de tipo descriptivo no experimental y su diseño es transversal analítico, en el cual se miden los potenciales factores de riesgo (individuales, sociales y ecológicos) y el desenlace (infección por *T. cruzi*).

### **7.2. Población**

En este estudio se incluyen zonas urbanas, periurbanas y rurales del municipio de La Mesa (Cundinamarca); el cual se encuentra 65 Km distante de la capital de la república, ubicado a una latitud Norte de 4° 38' 06" y una longitud Oeste de 74° 27' 58" del meridiano de Greenwich; el territorio se encuentra a una altitud media de 1.220 msnm con una temperatura promedio de 22°C a 24°C. Tiene una extensión de 148 Km<sup>2</sup> de los cuales 145 Km<sup>2</sup> corresponden al área rural, por lo que su principal fuente económica es la agricultura; el área urbana del municipio tiene una extensión de 3 Km<sup>2</sup>. De acuerdo al último censo realizado en la población de La Mesa, existen cerca de 29.566 habitantes. El municipio, está constituido en el área rural por 40 veredas y 20 barrios pertenecientes al área urbana <sup>(149)</sup>.

### **7.3. Diseño muestral**

Este estudio es parte del macroproyecto denominado: “Dinámica de transmisión de *Trypanosoma cruzi*, en zonas urbanas, periurbanas y rurales en la región andina – modelo municipio de La Mesa Cundinamarca”. Este trabajo cuenta con un muestreo por conveniencia no probabilístico en el cual se obtuvieron las muestras sanguíneas de humanos y caninos a partir de convocatorias de brigadas de salud, muestras sanguíneas de zarigüeyas obtenidas por captura y sedación en zonas rurales y muestras fecales de triatominos con la participación de la comunidad en la captura de estos.

A partir de ello, se obtuvieron 864 muestras de humanos y 281 muestras de caninos, estas muestras fueron tomadas en conjunto de un consentimiento informado y una encuesta sobre los hábitos y conocimientos de la enfermedad y el vector (Anexo 12),

con previa prueba piloto en el centro de La Mesa (Cundinamarca) y avalada por el gerente de la Red Chagas y Alcaldía de La Mesa (Cundinamarca), en el período comprendido de junio de 2015 a noviembre de 2017.

Este trabajo comprende las muestras de humanos y caninos positivos por serología (ELISA e IFI) con la implementación del kit ELISA Chagas III (Grupo Bios®) y anticuerpo secundario monoclonal anti humano y perro IgG-HRP de cabra: sc-2433 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC) y el kit de prueba de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta (INS-COLOMBIA). Estas muestras fueron sometidas a pruebas moleculares para la confirmación de la presencia de *T. cruzi*.

Se llevó a cabo la captura de triatominos y zangüeyas en diferentes zonas del municipio en las que se hizo la respectiva georreferenciación y descripción del ambiente físico, con el fin de resaltar las características del hábitat y vegetación circundante.

#### 7.3.1. Captura de triatominos

Se realizó la captura de 70 especímenes de hemípteros triatominos durante junio del 2015 y noviembre del 2017, de los cuales 26 especímenes fueron capturados en 7 barrios de la zona urbana, 23 especímenes en 4 veredas de la zona periurbana y 21 especímenes en 8 veredas de la zona rural del municipio; para esto se usaron dos métodos de captura: 1) captura manual y 2) captura mediante la utilización de cebo vivo que emplea la trampa descrita por Angulo, consistente en una jaula de alambre, en la cual se introduce un animal doméstico, preferiblemente un ave (*Gallus gallus*) disponible en la región en estudio<sup>(70) (130)</sup>. La trampa se colocó en probables refugios silvestres como huecos de árboles, cuevas debajo de rocas o piedras; y refugios peridomésticos como sitios de reposo de animales domésticos, detrás o debajo de objetos ubicados alrededor de la vivienda y depósitos de alimentos.

Los triatominos recolectados se colocaron en frasco individual con cama de papel filtro, cada frasco fue etiquetado para el transporte hasta el laboratorio de la Universidad Antonio Nariño, donde se realizó la clasificación morfológica (mediante las claves taxonómicas de Lent and Wygodzinsky), con la ayuda del entomólogo experto que hace parte del macroproyecto. Se realizó la extracción del ámpula rectal de triatominos vivos y muertos (Anexo 1 y 2) con su respectivo montaje en fresco entre lámina y laminilla, el cual fue visualizado en el microscopio en 40X para observar movimientos compatibles con flagelados. El ámpula rectal fue extraída (Anexo 1) y eluída en PBS para la extracción de ADN por el método de fenol-cloroformo con previa maceración (Anexo 3). El ADN de los triatominos se sometió a un proceso de purificación con lana de vidrio (Anexo 4) y kit

comercial “Purelink™ viral RNA/DNA kit” (Anexo 5), el cual elimina las trazas de fenol existentes en la muestra para su posterior análisis de PCR.

### 7.3.2. Captura de zarigüeyas

Se realizó la captura de 27 especímenes de *Didelphis marsupialis* durante junio de 2015 y noviembre de 2017, de los cuales 11 especímenes fueron capturados en 4 barrios de la zona urbana, 3 especímenes en 1 vereda de la zona perirubana y 13 especímenes en 3 veredas de la zona rural del municipio empleando trampas Tomahawk 26x9x9 (modelo 205 mediana) <sup>(75)</sup>; cuyo método se basa en atraer mamíferos con un cebo consistente en frutas (mango o banano maduro) y atún; o un cebo especial que contiene esencia de vainilla, avena, atún y mantequilla de maní. Con anterioridad, estas trampas se lavaron con agua o vinagre como medida preventiva, que permite la atracción del animal y disminuye la capacidad de detección olfativa de la trampa <sup>(40), (47), (54), (84), (101), (150)</sup>.

Las trampas se ubicaron, respetando las características crepusculares de la especie, se colocaron en las horas de la tarde (4:00 – 5:00 pm) y se revisaron a primera hora del día siguiente (6:00 am) <sup>(84)</sup>, los lugares seleccionados para ubicar estas trampas fueron zonas de extradomicilio, considerando como extradomicilio a las áreas alrededor de la casa en la cual los habitantes no tienen ningún tipo de enseres y que son poco visitadas por el mismo, en los troncos de los árboles, axilas de palmas, cuevas debajo de rocas, y detrás o debajo de objetos ubicados alrededor de la vivienda.

Una vez capturado el animal, se realizó restricción física para tranquilización con Ketamina a dosis de 5 mg/Kg y se extrajo una muestra sanguínea procedente de la vena coccígea ventral <sup>(75)</sup>. Esta muestra se dividió en contenedores con anticoagulante (EDTA) y sin anticoagulante y se adicionaron de cuatro a cinco gotas de sangre total en papel filtro.

El método de sangre en papel filtro permite tomar poca cantidad de muestra y facilita el procedimiento para el clínico cuando se realiza en lugares silvestres; la conservación se realizó en un sobre y se guardó en un lugar fresco, seco y en oscuridad <sup>(49), (151), (152)</sup>; y las muestras con anticoagulante se conservaron a 4°C hasta su procesamiento. Las muestras obtenidas fueron procesadas para la extracción de ADN por el método fenol-cloroformo (Anexo 2); posteriormente, se purificaron mediante el protocolo Purelink™ viral RNA/DNA kit (Anexo 5), el cual elimina las trazas de fenol existentes en la muestra para su posterior análisis de PCR.

Una vez recuperados de la tranquilización, los animales fueron marcados con violeta de genciana en la zona lumbar para evitar recaptura y se liberaron en el lugar de captura.

#### **7.4. Criterios de inclusión y exclusión**

Se excluyó del estudio aquella muestra de humano que no completara la información del consentimiento informado.

#### **7.5. Descripción de variables**

7.5.1. Variable dependiente: diagnóstico de la infección.

7.5.2. Variable independiente: factores de riesgo asociados al desenlace.

#### **7.6. Técnicas de procesamiento y análisis de datos**

##### **7.6.1. Cuantificación de ADN**

Todas las muestras de ADN fueron cuantificadas de manera cualitativa mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y cuantitativa con el Nanodrop 2000 perteneciente al Instituto de Genética de la Universidad Nacional para conocer la cantidad exacta de ADN presente en cada una, y de esta manera ajustar la concentración necesaria para cada protocolo de PCR.

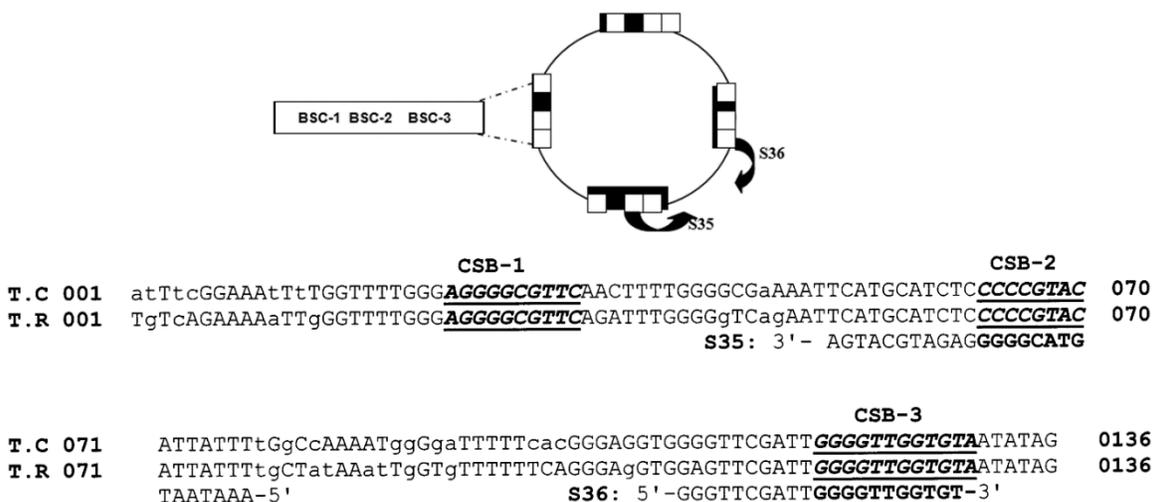
##### **7.6.2. PCR**

###### **7.6.2.1. PCR con los cebadores LCO 1940 – HCO 2198**

Las muestras de triatomíneos fueron sometidas a este protocolo. Se usaron cebadores de ADN universal que amplifican un fragmento de 710pb del gen mitocondrial citocromo C oxidasa subunidad I (COI); los cebadores utilizados fueron: LCO1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' y HCO2198: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'; L y H se refieren a las hebras de ADN pesadas, CO se refiere a citocromo oxidasa, y los números (1490 y 2198) se refieren a la posición de los nucleótidos. El LCO1490 y HCO2198 amplifican el ADN de más de 80 especies de invertebrados de 11 familias. Los parámetros de corrido fueron: Desnaturalización 94°C 1 minuto, seguido por un amplificación de 40 ciclos (94°C 1 minuto, 45°C 2 minutos, 72°C 3 minutos) y extensión final de 68°C 5 minutos (Anexo 6 y 9) <sup>(153)</sup>.

### 7.6.2.2. PCR con los cebadores S35 y S36

Todas las muestras de triatominos y zangüeyas, y las muestras de humanos y caninos positivas confirmadas por pruebas serológicas (ELISA e IFI) fueron sometidas a este protocolo. En este protocolo los cebadores utilizados fueron S35 5'- AAA TAA TGT ACG GGT GGA GAT GCA TGA -3' y S36 5'-GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT -3' que amplifican un fragmento de 330 pb para *T. cruzi* y 300 a 450 pb para *T. rangeli*. Los parámetros de corrido fueron: Desnaturalización 94°C 1 minuto, seguido por un amplificación de 30 ciclos (95°C 1 minuto, 60°C 1 minuto, 72°C 1 minuto) y extensión final de 68°C 5 minutos (Anexo 7 y 9) <sup>(53) (16) (83) (113) (100) (135)</sup>.

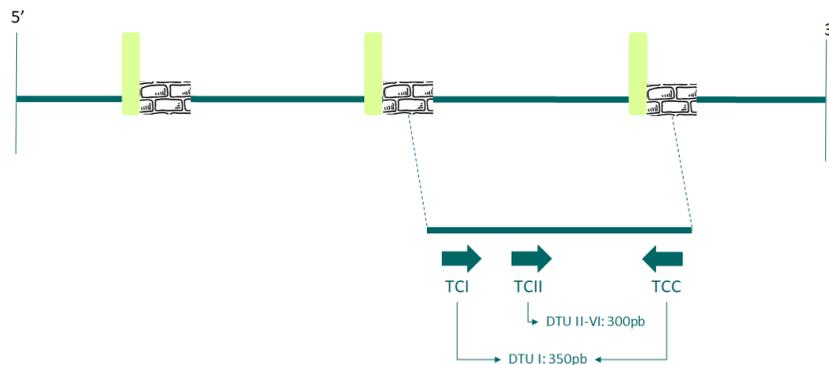


**Figura 14.** Secuencias conservadas de S35-S36. Arriba: Representación esquemática de los minicírculos de cuatro regiones conservadas. Las cajas en negro representan las regiones conservadas y las cajas en blanco los bloques de secuencias conservadas, las flechas indican la región en donde anillan cada uno de los cebadores. Abajo: Alineación de secuencias de consenso de *T. cruzi* regiones conservadas 134 pb minicírculo kADN (GenBank M18814-M18816 M18814-M18816, M19174-M19181, M19185-M19192) y *T. rangeli* (GenBank L19388 adhesiones-L19395, L28038-L28039). Los tres bloques de secuencias conservadas (CSB 1-3). Las letras mayúsculas representan un nivel de consenso superior al 60% y las letras minúsculas representan un nivel de consenso de hasta el 50%. Las secuencias y los sitios de hibridación de los cebadores S35 y S36 se muestran a continuación las secuencias de consenso. Modificada de Vallejo, G; Guhl, F; Chiari, E; Macedo, A. 1999. Y Pavia, P. 2011 <sup>(53), (83)</sup>.

Se realizó un algoritmo diagnóstico para la determinación de los diferentes DTUs de *T. cruzi* presentes en las muestras: las muestras positivas con los cebadores S35 y S36 amplificadas a una banda de 300pb fueron confirmatorias para la presencia de *T. cruzi* y se sometieron al protocolo de amplificación con los cebadores TCI, TCII y TCC; las muestras amplificadas a 350pb fueron clasificadas como TcI y las muestras que amplificaron a 300pb fueron clasificadas como otros DTUs.

### 7.6.2.3. PCR con los cebadores TCI, TCII y TCC

En este protocolo se usaron cebadores para la amplificación de la región intergénica de los genes del miniexón de *T. cruzi*, los cuales determinan el DTU al que pertenecen los aislados. Los cebadores utilizados fueron TCI: 5'- GTG TCC GCC ACC TCC TTC GGG CC -3', TCII: 5'- CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G -3' y TCC: 5'-CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG -3' que amplifican un fragmento de 350pb para DTU I y 300pb para otros DTU. Los parámetros de corrido fueron: Desnaturalización 94°C 1 minuto, seguido por un amplificación de 27 ciclos (94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 30 segundos) y extensión final de 68°C 5 minutos (Anexo 8 y 9) <sup>(16), (44), (62), (79), (83), (113), (115), (119), (154)</sup>.



**Figura 16.** Diagrama del locus del gen miniexon de *T. cruzi*. El locus está organizado en unidades repetidas en tándem, las cajas representan la región codificante y en verde el splice leader (miniexón) (39 nt). Las regiones intergénicas entre cada unidad está representada por la línea verde oscura. El iniciador TCC, (flecha a la derecha) anilla en la secuencia conservada de la región codificante del gen en todas las DTUs del parásito y los iniciadores específicos de cada DTU están localizados en la región intergénica (flechas a la izquierda). Fuente: Elaboración propia, modificado de Pavia, P. 2011 <sup>(83)</sup>.

### 7.6.3. Hemaglutinación indirecta (HAI)

Las muestras de zarigüeyas procedentes de la vena caudal, fueron sometidas a la prueba de HAI como método diagnóstico con el fin de evidenciar la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* presentes en el suero de estas (Anexo 10).

### 7.6.4. Análisis estadísticos

Se construyeron formularios de ingreso para humanos, caninos, triatominos, zarigüeyas y encuestas mediante el programa Epi Info 7.0, en los cuales se colocaron los respectivos datos de cada una de las muestras y sus resultados para las diferentes pruebas

analizadas; se realizó tabulación de datos, frecuencias, tablas cruzadas, gráficos de sectores para las áreas muestreadas y la asociación entre los desenlaces y los factores de riesgo hallados a través de las encuestas <sup>(139)</sup>.

### **7.7. Consideraciones éticas**

En este estudio, se tuvo en cuenta la Ley 84 de 1989, el Decreto 1376 de 2013 y la Resolución 8430 de 1993, los cuales permiten los procesos de captura, remoción o extracción temporal o definitiva del medio natural, de especímenes de la diversidad biológica para la obtención de información científica con fines no comerciales <sup>(130), (155)</sup>. Los animales seleccionados se trataron como seres sensibles, evitando el disconfort, la angustia y el dolor, mediante procedimientos poco invasivos o anestesia para evitar el sufrimiento, debido a que los resultados de este estudio no pueden obtenerse por otros procedimientos y las experiencias son necesarias para el control y prevención de la enfermedad que afectan al humano y al animal <sup>(156),(157)</sup>, utilizando el mínimo número requerido para obtener resultados científicamente válidos, cumpliendo con las reglamentaciones vigentes <sup>(157)</sup>.

### **7.8. Consentimiento de información**

Las muestras obtenidas en el macroproyecto cuentan con un consentimiento informado en donde se expresa claramente al humano y al propietario de los caninos la intencionalidad del estudio, para que este decida libremente su participación <sup>(157)</sup>.

## 8. RESULTADOS

El periodo de muestreo estuvo comprendido entre junio de 2015 y noviembre de 2017, en el cual se obtuvieron muestras de un total de 27 lugares muestreados: 13 pertenecientes a la zona urbana (La Mesa[2], La Esperanza [4], La Perla [5], La Perlita [6], José Antonio Olaya [7], Los Naranjos [10], Toledo [11], Las Ceibas [12], Santa Bárbara [13], El Recreo [14], Rincón Santo [19], Álvarez Díaz [25] y Marsella [26]), 10 pertenecientes a la zona rural (El Palmar [1], Zapata [15], El Hato [16], La Vega [17], El Paraíso [18], Hungría [20], San Martín [21], Hospicio [22], El Espino [23] y El pedregal [27]) y 4 pertenecientes a la zona periurbana (San Joaquín [3], Villas del Nuevo Siglo [8], San Nicolás [9] y El cucharal [24]) (Fig. 17).

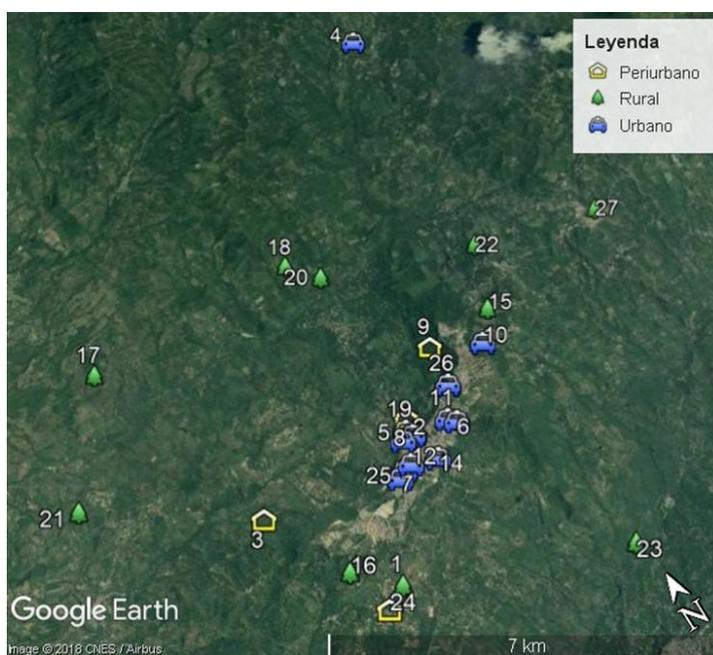
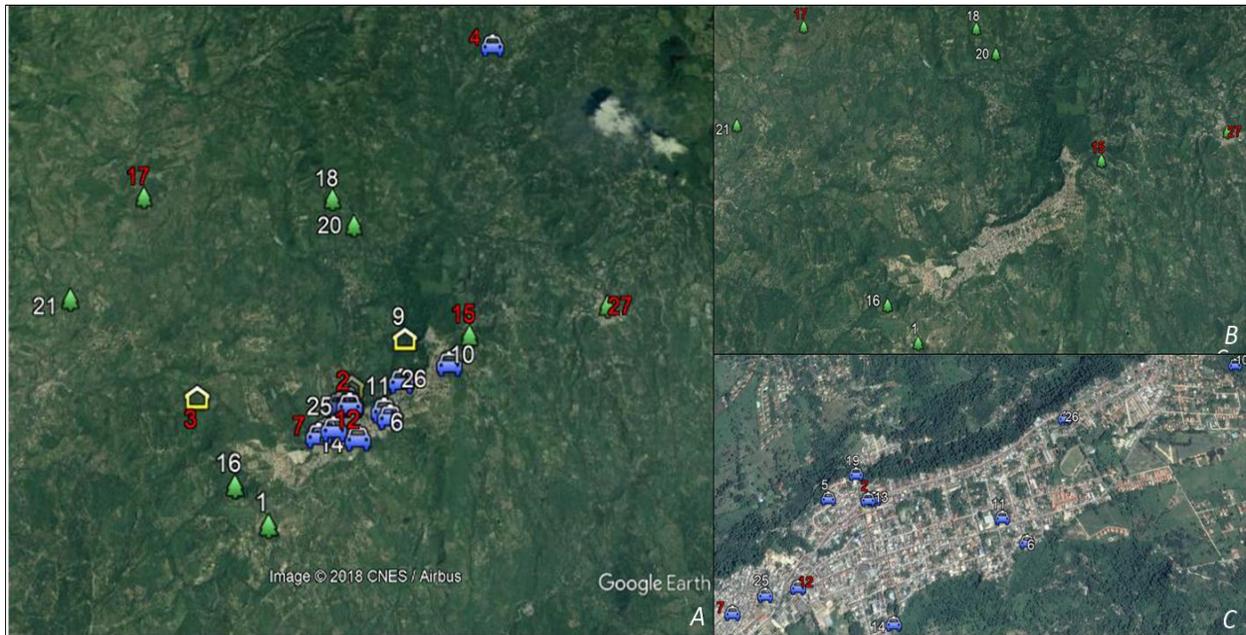


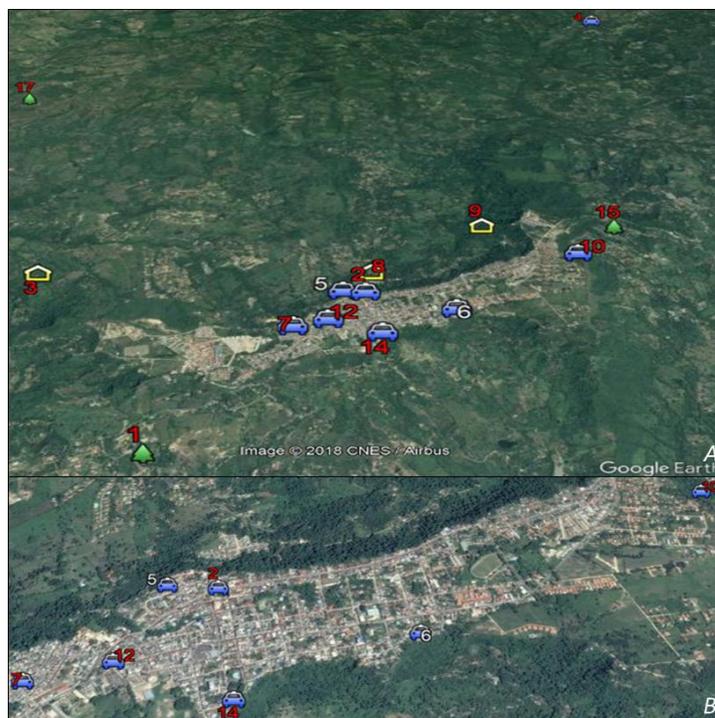
Figura 17. Barrios y veredas muestreados. Fuente: Elaboración propia.

A partir de las brigadas establecidas para la toma de muestras se obtuvo un total de 864 muestras de humanos en 24 de las zonas totales muestreadas; 460 muestras pertenecientes a 13 barrios de la zona urbana, de los cuales: La Mesa, La Esperanza, José Antonio Olaya y Las Ceibas presentan humanos positivos, 150 muestras pertenecientes a 7 veredas de la zona rural, de los cuales: Zapata, La Vega y El Pedregal presentan humanos positivos y 254 muestras pertenecientes a 3 veredas de la zona periurbana, de los cuales: San Joaquín y Villas del Nuevo Siglo presentan humanos positivos; la positividad de los métodos serológicos utilizados (ELISA e IFI) está representada por la presencia de anticuerpos de tipo IgG contra *T. cruzi* detectados en muestras de humanos (Fig. 18).



**Figura 18.** Barrios y veredas muestreados para humanos con resultados positivos (rojo). A) Total de barrios muestreados para humanos, B) Ampliación de las veredas del área rural muestreadas para humanos, C) Ampliación de los barrios del área urbana muestreadas para humanos. Fuente: Elaboración propia.

Así mismo, se obtuvo un total de 281 muestras de caninos en 14 de las zonas totales muestreadas; 155 muestras pertenecientes a 8 barrios de la zona urbana, de los cuales: La Mesa, La Esperanza, José Antonio Olaya, Los naranjos, Las Ceibas y El Recreo presentan caninos positivos, 76 muestras pertenecientes a 3 veredas de la zona rural, de los cuales: El Palmar, Zapata y La Vega presentan caninos positivos y 50 muestras pertenecientes a 3 veredas de la zona periurbana, de los cuales: San Joaquín, Villas del Nuevo Siglo y San Nicolás presentan caninos positivos; la positividad de los métodos serológicos utilizados (ELISA e IFI) está representada por la presencia de anticuerpos de tipo IgG contra *T. cruzi* detectados en muestras de caninos (Fig. 19).

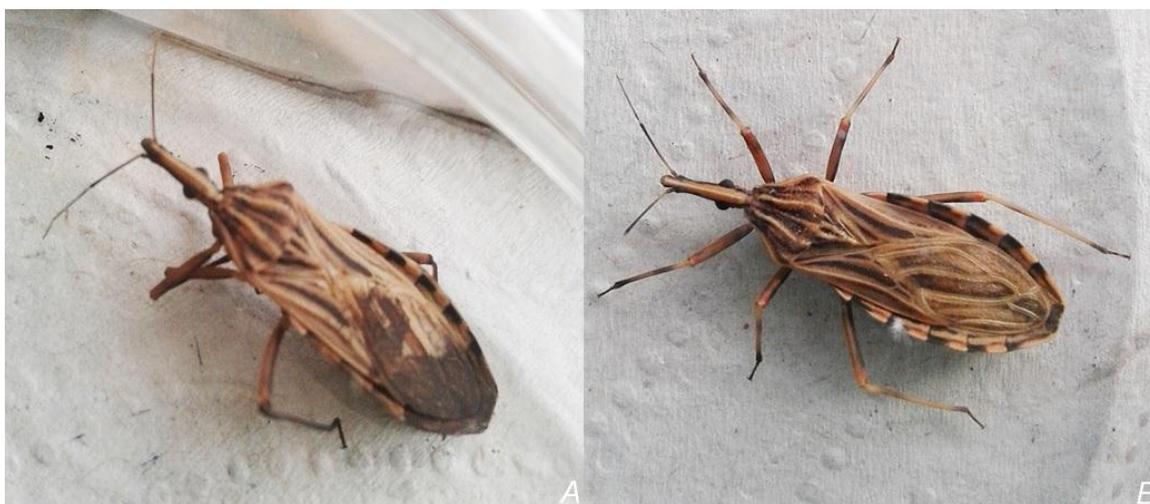


**Figura 19.** Barrios y veredas muestreados para caninos con resultados positivos (rojo). A) Total de barrios muestreados para caninos, B) Ampliación de los barrios del área urbanas muestreadas para caninos. Fuente: Elaboración propia.

Adicional a las brigadas de muestreo para humanos y caninos, se realizó la captura de 70 triatominos, de las especies *Pastrongylus geniculatus* y *Rhodnius colombiensis*, mediante la utilización de cebo vivo empleando la trampa descrita por Angulo, en la cual se introdujo un ave (*Gallus gallus*) disponible en la región de estudio y se le suministró alimento suficiente para el periodo de muestreo; la jaula fue completamente recubierta con cinta pegante, con la parte adhesiva expuesta. Los triatominos son atraídos por señales como el CO<sub>2</sub> y el calor proporcionado por el animal. Cuando el triatominos intenta ingresar a la jaula es retenido por la parte adhesiva de la cinta. Luego de esto los triatominos se recolectaron y se colocaron en frasco individual con una cama de papel filtro (Fig. 20 y 21).



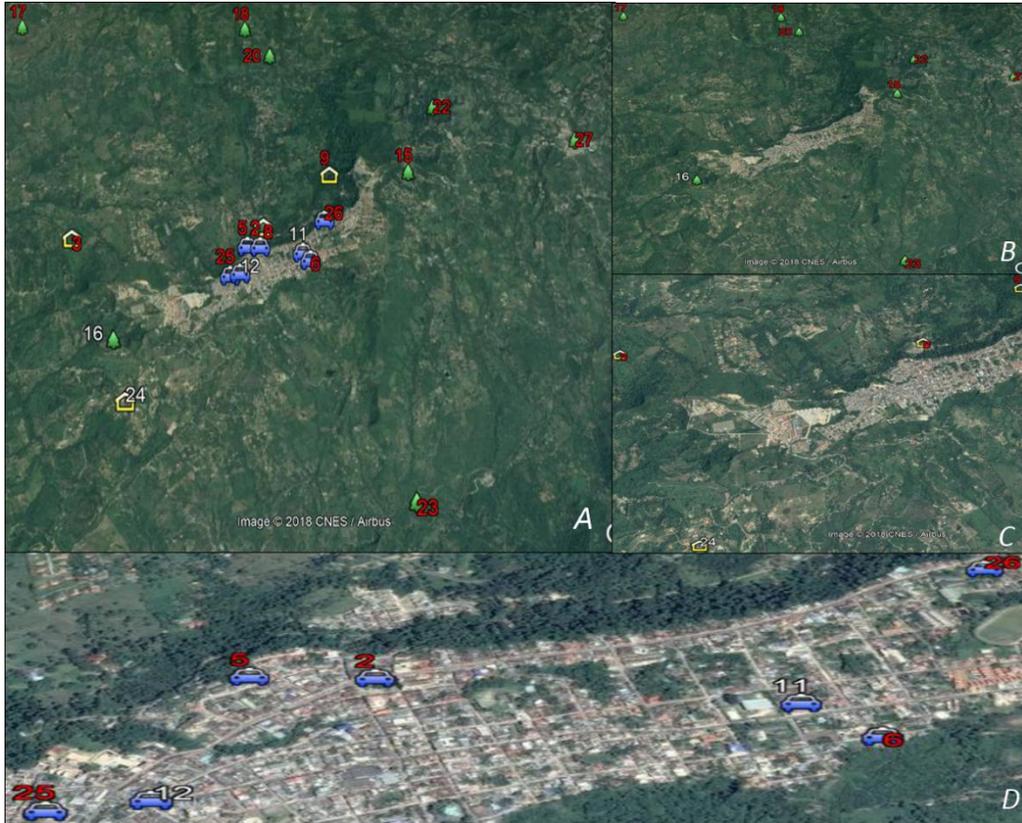
**Figura 20.** Captura de triatominos. A) Ave (*Gallus gallus*) procedente de la región y con el alimento suficiente para el periodo de captura, B) Cubrimiento de la jaula con cinta pegante con la parte adhesiva expuesta, C) Jaula lista para ser colocada en el sitio de muestreo, D) Jaula ubicada en el sitio de muestreo. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 21.** Dos ejemplares de triatominos capturados. A) Macho de la especie *Rhodnius colombiensis*, B) Hembra de la especie *Rhodnius colombiensis*. Fuente: Elaboración propia.

Los 70 triatominos capturados se encontraron en 19 zonas del total de lugares muestreados; 26 muestras en 7 barrios de la zona urbana de las cuales: La Mesa, La Perla, La perlita, Álvarez Díaz y Marsella presentan triatominos positivos, 21 muestras en 8 veredas de la zona rural, de los cuales: Zapata, La Vega, El Paraíso, Hungría, Hospicio, El Espino y El Pedregal presentan triatominos positivos y 23 muestras en 4

veredas de la zona periurbana, de los cuales: San Joaquín, Villas del Nuevo Siglo y San Nicolás presentan triatominos positivos; la positividad de los métodos parasitológicos utilizados está representada por la presencia de *T. cruzi* en el examen en fresco o ADN de *T. cruzi* en PCR en muestras de triatominos (Fig. 22).



**Figura 22.** Barrios y veredas muestreados para triatominos con resultados positivos (rojo). A) Total de barrios muestreados para triatominos, B) Ampliación de las veredas del área rural muestreadas para triatominos, C) Ampliación de las veredas del área periurbana muestreadas para triatominos, D) Ampliación de los barrios muestreados para triatominos. Fuente: Elaboración propia.

Empleando trampas Tomahawk, se capturaron 27 especímenes de *Didelphis marsupialis* atraídas por un cebo consistente en mango, guanábana y atún, depositado en el fondo de la jaula y hacia la periferia de esta, verificando siempre que la trampa quedara abierta, nivelada y el pedal completamente accionado, para que al ingresar la zarigüeya quedara capturada sin producirle daño alguno. Luego de la captura, se realizó la inspección de las características fisiológicas y condición corporal del animal (Fig. 23 y 24).



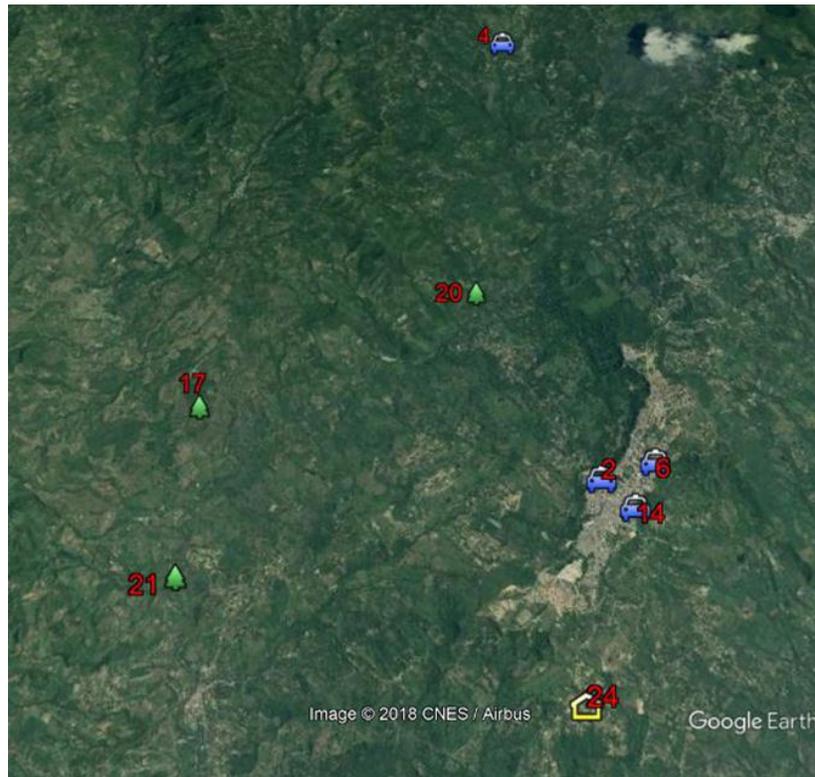
**Figura 23.** Captura de zarigüeyas. A) y B) Vista de frontal y superior de la trampa y el cebo alojado en su interior, C) Trampa colocada en el lugar de muestreo, D) captura efectiva de un espécimen de *Didelphis marsupialis*. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 24.** Inspección de las características fisiológicas y corporales. A) y B) Especimen de *Didelphis marsupialis* capturado, C) Marsupio y presencia de crías en su interior, D) Inspección de características fisiológicas de la especie. Fuente: Elaboración propia.

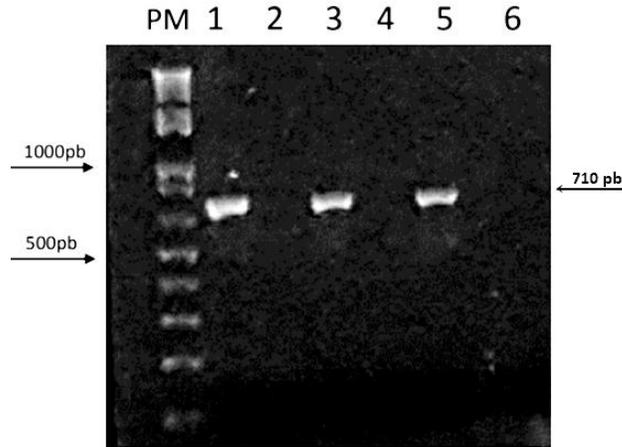
Las 27 zarigüeyas capturadas se encontraron en 8 zonas del total de lugares muestreados; 11 muestras en 4 barrios de la zona urbana con presencia de zarigüeyas positivas en todos los lugares muestreados, 13 muestras en 3 veredas de la zona rural

con presencia de zarigüeyas positivas en todos los lugares muestreados y 3 muestras en 1 vereda de la zona periurbana con presencia de zarigüeyas positivas en el único lugar muestreado; la positividad del método serológico utilizado (HAI) está representada por la presencia de anticuerpos de tipo IgM e IgG contra *T. cruzi* detectados en muestras de zarigüeyas (Fig. 25).



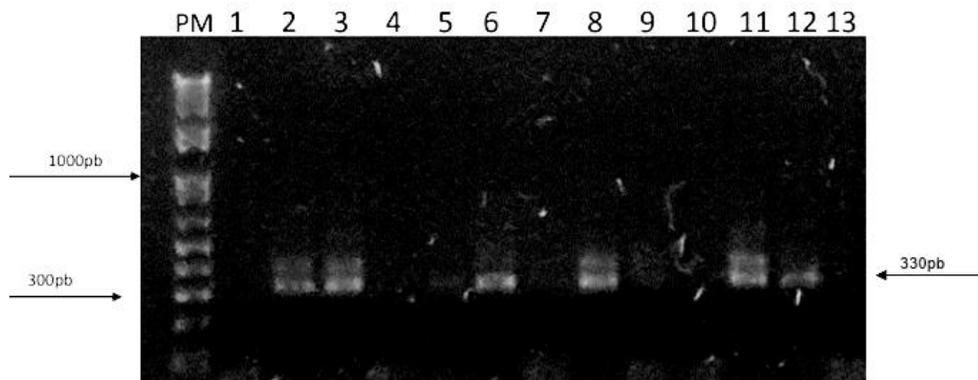
**Figura 25.** Barrios y veredas muestreados para zarigüeyas con resultados positivos (rojo). Fuente: Elaboración propia.

Luego de la obtención de las muestras, se realizó extracción y limpieza del ADN de las muestras provenientes del ámpula rectal de los triatominos capturados (Anexo 1, 3, 4 y 5), se realizó el protocolo de LCO-HCO para verificar la integridad del ADN mediante la evaluación del gen Housekeeping, siguiendo los parámetros establecidos en el anexo 6 con el termociclador “Illumina Eco Real Time PCR system” y Taq Polimerasa “Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity”. Los resultados obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, siguiendo los parámetros establecidos en el anexo 9 (Fig. 26).



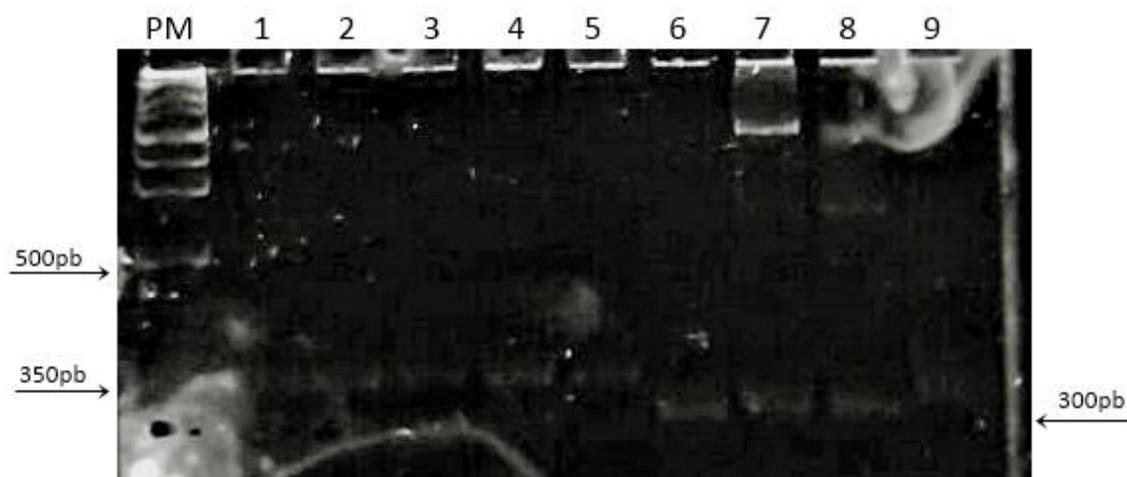
**Figura 26.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación del ADN de triatominos con el gen Housekeeping (LCO-HCO) que arroja una banda de 710pb. PM Marcador de peso molecular 1Kb Invitrogen, Carril 1 (T07), Carril 2 (T012), Carril 3 (T024), Carril 4 (T027), Carril 5 (control positivo ADN de *T. cruzi* otorgado por Pavía, P), Carril 6 (control negativo sin muestra de ADN). Fuente: Elaboración propia.

Las muestras de humanos y caninos positivos en pruebas serológicas (ELISA e IFI) y las muestras sanguíneas de zarigüeyas se sometieron a extracción y cuantificación de ADN (Anexo 2); luego de esto, todas las muestras incluidas las de triatominos se sometieron al protocolo de S35-S36 para verificar la presencia de ADN positivo para *T. cruzi* diferenciándolo de *T. rangeli*, siguiendo los parámetros establecidos en el anexo 7 con el termociclador “Illumina Eco Real Time PCR system” y Taq Polimerasa “Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity”. Los resultados obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, siguiendo los parámetros establecidos en el anexo 9 (Fig. 27).



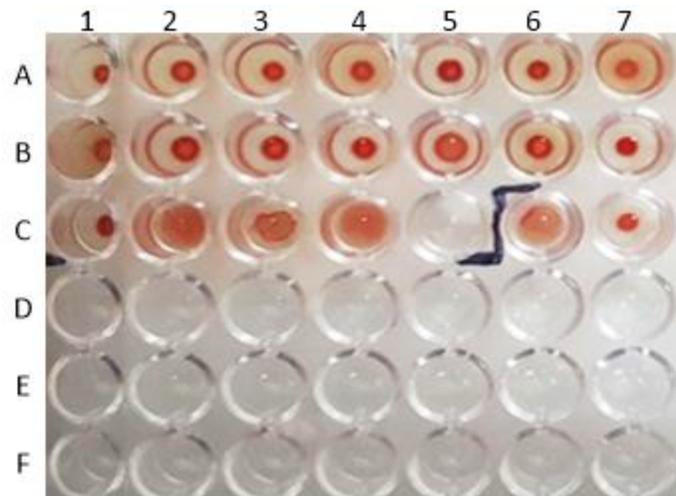
**Figura 27.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación del ADN de triatominos con el protocolo de ADN del kinetoplasto (S35-S36) que arroja una banda de 330pb para *T. cruzi* y 300-450pb para *T. rangeli*. PM Marcador de peso molecular 1Kb Invitrogen, Carril 1 (T04), Carril 2 (T05), Carril 3 (T012), Carril 4 (T020), Carril 5 (T024), Carril 6 (T027), Carril 7 (T032), Carril 8 (T033), Carril 9 (T035), Carril 10 (T037), Carril 11 (T052), Carril 12 (control positivo ADN de *T. cruzi* otorgado por Pavía, P), Carril 13 (control negativo sin muestra de ADN). Fuente: Elaboración propia.

Las muestras de humanos, caninos y zarigüeyas no presentaron amplificación alguna para S35-S36. Las muestras de triatominos positivos para S35-S36 fueron sometidas al protocolo de TCI-TCII-TCC, para determinar el tipo de DTU presente en las muestras diferenciando DTU I de otros DTUs, siguiendo los parámetros establecidos en el anexo 8 con el termociclador “Illumina Eco Real Time PCR system” y Taq Polimerasa “Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity”. Los resultados obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, siguiendo los parámetros establecidos en el anexo 9 (Fig. 28).



**Figura 28.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación del ADN de triatominos con el gen del miniexón (TCI-TCII-TCIII) que arroja una banda de 350pb para DTU I y 300pb para otros DTUs. PM Marcador de peso molecular 1Kb Invitrogen, Carril 1 (T05), Carril 2 (T07), Carril 3 (T024), Carril 4 (T052), Carril 5 (control positivo para el DTUI de *T. cruzi* otorgado por Pavía, P), Carril 6 (T03), Carril 7 (T033), Carril 8 (control positivo para el DTU III otorgado por el INS), Carril 9 (control negativo sin muestra de ADN). Fuente: Elaboración propia.

Debido a que las zarigüeyas no presentaron amplificación en el protocolo de S35-S36 y su concentración de ADN era demasiado baja, y al no existir una alternativa serológica para su diagnóstico como ELISA o IFI, fueron sometidas al protocolo de Hemaglutinación Indirecta (HAI), siguiendo los parámetros establecidos en el anexo 10, con el fin de verificar la presencia de positividad de las muestras para *T. cruzi* (Fig. 29).



**Figura 29.** Hemaglutinación Indirecta (HAI) en muestras de zarigüeyas. Pozos: A1 (SZ01), A2 (SZ03), A3 (SZ06), A4 (SZ08), A5 (SZ09), A6 (SZ11), A7 (SZ02), B1 (SZ04), B2 (SZ13), B3 (SZ14), B4 (SZ18), B5 (SZ05), B6 (SZ19), B7 (SZ23), C1 (SZ25), C2 (SZ07), C3 (SZ03), C4 (SZ12), C5 (Blanco), C6 (control positivo), C7 (control negativo). Fuente: Elaboración propia.

Las muestras de humanos y caninos se clasificaron de acuerdo al sexo, la zona y las diferentes técnicas realizadas con su respectivo resultado y porcentaje. Las muestras de humanos no dieron amplificación alguna para el protocolo de PCR S35-S36; sin embargo, mediante métodos serológicos (ELISA e IFI) se encontró un total de 7 mujeres y un hombre positivos en la zona urbana, 3 mujeres y ningún hombre positivo en la zona rural, y 4 mujeres y 2 hombres positivos en la zona periurbana para un total de 17 humanos positivos para la presencia de anticuerpos de tipo IgG contra *T. cruzi* (Tabla. 3).

**Tabla 3.** Número y porcentaje de humanos clasificados según el sexo, la zona y los métodos diagnósticos. Fuente: Elaboración propia.

SEXO	N	%	Zona	N	%	ELISA E IFI	N	%	PCR	N	%
Femenino	526	60,88	Urbano	278	52,85	Positivo	7	2,52	Negativo	7	100%
						Negativo	271	97,48	Negativo	271	100
			Rural	84	15,97	Positivo	3	3,57	Negativo	3	100
						Negativo	81	96,43	Negativo	81	100
			Periurbano	164	31,18	Positivo	4	2,44	Negativo	4	100
						Negativo	160	97,56	Negativo	160	100
Masculino	338	39,12	Urbano	182	53,85	Positivo	1	0,55	Negativo	1	100
						Negativo	181	99,45	Negativo	181	100
			Rural	66	19,53	Positivo	0	0	Negativo	0	100
						Negativo	66	100	Negativo	66	100
			Periurbano	90	26,63	Positivo	2	2,22	Negativo	2	100
						Negativo	88	97,78	Negativo	88	100
Total	864	100		864			864			864	

Al igual que en humanos, las muestras de caninos no presentaron amplificación para el protocolo de PCR S35-S36; sin embargo, mediante métodos serológicos (ELISA e IFI) se encontró un total de 20 hembras y 22 machos positivos en la zona urbana, 19 hembras

y 28 machos positivos en la zona rural, y 4 hembras y 8 machos positivos en la zona periurbana, para un total de 101 caninos positivos para la presencia anticuerpos de tipo IgG contra *T. cruzi* (Tabla. 4).

**Tabla 4.** Número y porcentaje de caninos clasificados según el sexo, la zona y los métodos diagnósticos. Fuente: Elaboración propia.

Sexo	N	%	Zona	N	%	ELISA e IFI	N	%	PCR	N	%
Hembra	120	42,70	Urbano	71	59,17	Positivo	20	28,17	Negativo	20	100
						Negativo	51	71,83	Negativo	51	100
			Rural	29	24,17	Positivo	19	65,52	Negativo	19	100
						Negativo	10	34,48	Negativo	10	100
			Periurbano	20	16,67	Positivo	4	20	Negativo	4	100
						Negativo	16	80	Negativo	16	100
Macho	161	57,30	Urbano	84	52,17	Positivo	22	26,19	Negativo	22	100
						Negativo	62	73,81	Negativo	62	100
			Rural	47	29,19	Positivo	28	59,57	Negativo	28	100
						Negativo	19	40,43	Negativo	19	100
			Periurbano	30	18,63	Positivo	8	26,67	Negativo	8	100
						Negativo	22	73,33	Negativo	22	100
	281	100		281			281			281	

Los triatomíneos capturados se clasificaron según la especie, estadio y zona de captura; se halló un total de 10 hembras, 4 machos y 3 ninfas de *Panstrongylus geniculatus* y 4 hembras, 5 machos y ninguna ninfa de *Rhodnius colombiensis* en la zona urbana, 4 hembras, 7 machos y ninguna ninfa de *P. geniculatus* y 7 hembras, 3 machos y ninguna ninfa de *R. colombiensis* en la zona rural, 1 hembra, 8 machos y ninguna ninfa de *P. geniculatus* y 6 hembras, 7 machos y 1 ninfa de *R. colombiensis* en la zona periurbana.

Así mismo las muestras se clasificaron en el ambiente de captura y los resultados obtenidos en los métodos diagnósticos, encontrando: 20 triatomíneos en el ambiente intradomiciliario de los cuales 8 se encontraban positivos para examen en fresco y PCR con presencia del DTU I y 7 de los 12 negativos en examen en fresco se encontraron positivos para PCR con presencia de los DTU I y se asumió otros DTUs como DTU II por su gran manifestación en Colombia, 3 triatomíneos en el ambiente peridomiciliarias de los cuales dos se encontraban positivos para examen en fresco y PCR con presencia de DTU I; se obtuvieron 47 triatomíneos ayudados a capturar por habitantes de la comunidad y de los cuales no se obtuvo un dato preciso sobre el ambiente encontrado por lo cual se clasificaron como sin dato, de los cuales 13 se encontraban positivos para examen en fresco y PCR con presencia del DTU I y II y 11 de los 34 negativos para examen en fresco se encontraron positivos para PCR con presencia del DTU I y II (Tabla. 5).

**Tabla 5.** Número y porcentaje de triatomíneos clasificados según la especie, estadio, la zona, el ambiente y los métodos diagnósticos. Elaboración propia.

Especie	N	%	Estadio	N	%	Zona	N	%	Ambiente	N	%	Examen en fresco	N	%	PCR			DTU				
															N	%	I	N	%	II	N	%
P. geniculatus	37	52,86	Hembra	15	40,54	Urbano	10	66,67	Intradomiciliario	20	28,57	Positivo	8	40	Positivo	8	100	I	8	100		
							Rural	4					26,67	Negativo	0	0	II	0	0			
							Periurbano	1					6,67	SD	0	0						
			Macho	19	51,35	Urbano	4	21,05				Negativo	12	60	Positivo	7	58,33	I	5	71,43		
							Rural	7							36,84	Negativo	3	25	II	2	28,57	
							Periurbano	8							42,11	SD	2	16,67				
	Ninfa	3	8,11	Urbano	3	100	Positivo	2	66,67	Positivo	2	100	I	2	100							
					Rural	0				0	Negativo	0	0	II	0	0						
					Periurbano	0				0	SD	0	0									
	R. colombiensis	33	47,14	Hembra	17	51,52	Urbano	4	23,53	Peridomiciliario	3	4,29	Negativo	1	33,33	Positivo	0	0	I	-	-	
								Rural	7							41,18	Negativo	1	100	II	-	-
								Periurbano	6							35,29	SD	0	0			
Macho				15	45,45	Urbano	5	33,33	Positivo				13	27,66	Positivo	13	100	I	10	76,92		
							Rural	3							20	Negativo	0	0	II	3	23,08	
							Periurbano	7							46,67	SD	0	0				
Ninfa		1	3,03	Urbano	0	0	Negativo	34	72,34	Positivo	11	32,35	I	5	45,45							
					Rural	0				0	Negativo	21	61,76	II	6	54,55						
					Periurbano	1				100	SD	2	5,88									
Total		70			70			70														
Total		70			70			70														

La PCR tuvo un rango de detección más amplio que el examen en fresco puesto que 41 (58,57%) triatomíneos fueron encontrados positivos con este método, mientras que solo 23 (32,86%) triatomíneos se encontraban positivos para el examen en fresco (Tabla. 6).

**Tabla 6.** Sensibilidad de las técnicas diagnósticas utilizadas para las muestras de triatomíneos. Fuente: Elaboración propia.

Técnica	N	%
Examen en Fresco	23	32,86%
PCR	41	58,57%

Sin importar el ambiente en el que los triatomíneos fueron capturados, existe un predominio del DTU I en las diferentes muestras analizadas frente a los otros DTUs puesto que de 41 triatomíneos positivos para PCR, 30 (73,20%) tenían presencia del DTU I y 11 (26,80%) para otras DTUs (Tabla. 7).

**Tabla 7.** Número y porcentaje de los DTUs presentes en los triatomíneos positivos para PCR. Fuente: Elaboración propia.

	N	%
DTU I	30	73,20%
OTROS DTU	11	26,80%
TOTAL	41	100%

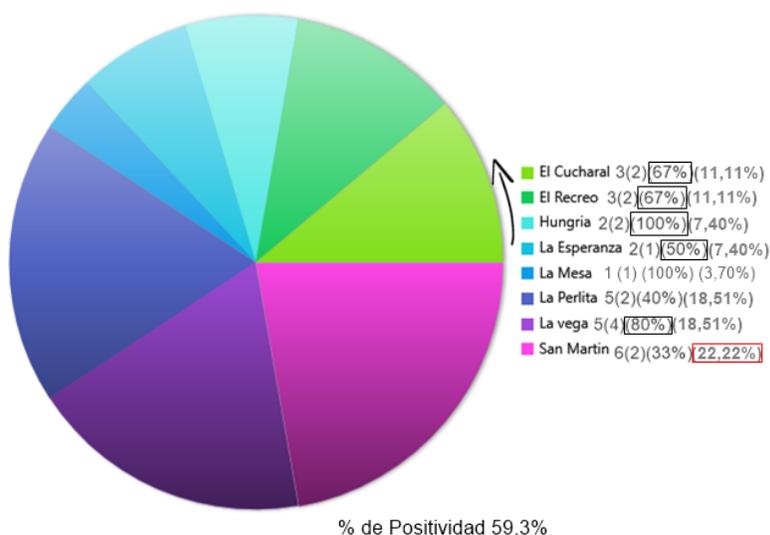
Las muestras de zarigüeyas capturadas se clasificaron según la especie, el sexo, la condición corporal y la zona de captura. Todas las zarigüeyas muestreadas fueron de la especie *Didelphis marsupialis* y no dieron amplificación alguna para el protocolo de PCR S35-S36. Se encontró un total de 15 hembras y 10 machos en buena condición corporal, de las cuales 2 hembras y 2 machos capturados en zona urbana se encontraban reactivos, 5 hembras y 3 machos capturados en zona rural se encontraban reactivos y 1 hembra y 1 macho capturados en zona periurbana se encontraban reactivos; la reactividad del método serológico utilizado (HAI) está representada por la presencia de anticuerpos de tipo IgM e IgG contra *T. cruzi* detectados en muestras de zarigüeyas. También se realizó la captura de una hembra y un macho en baja condición corporal; sin embargo, solo una hembra de la zona urbana se halló reactiva para la presencia de anticuerpos de tipo contra *T. cruzi* (Tabla. 8).

**Tabla 8.** Número y porcentaje de zarigüeyas clasificadas según la especie, sexo, condición corporal, la zona y los métodos diagnósticos. Fuente: Elaboración propia.

Especie	N	%	Sexo	N	%	Condicion Corporal	N	%	Zona	N	%	HAI		PCR							
												N	%	N	%						
<i>Didelphis marsupialis</i>	27	100	Hembra	16	59,26	Buena	15	94	Urbano	6	40	Positiva	2	33,33	Negativa	2	100				
									Rural	7	47	Positiva	5	71	Negativa	5	100				
									Periurbano	2	13	Positiva	1	50	Negativa	2	100				
						Baja	1	6	Urbano	1	100	Positiva	1	100	-	-	1	100			
									Rural	0	0	Negativa	0	0	-	-	0	100			
									Periurbano	0	0	Positiva	-	-	-	-	-	100			
			Macho	11	40,74	Buena	10	91	Urbano	3	30	Positiva	2	67	Negativa	2	100				
									Rural	6	60	Negativa	1	33	Negativa	1	100				
									Periurbano	1	10	Positiva	3	50	Negativa	3	100				
						Baja	1	9	Urbano	1	100	Positiva	1	100	Negativa	1	100				
									Rural	0	0	Negativa	0	0	-	-	0	100			
									Periurbano	0	0	Positiva	0	0	Negativa	0	100				
Total	27			27			27			27					27						

Mediante los diferentes métodos empleados para la identificación de la presencia de *T. cruzi* se encontraron porcentajes de positividad de: 1,97% para muestras de humanos, 35,9% para muestras de caninos, 58,7% para muestras de triatominos y 59,3% para muestras de zarigüeyas (Fig. 30) (Anexo 17).

Muestreo de Zarigüeyas en La Mesa Cundinamarca



**Figura 30.** Muestreo de zarigüeyas en La Mesa (Cundinamarca). División por los diferentes barrios muestreados, de izquierda a derecha: Número de muestras, Número de muestras halladas positivas por alguno de los métodos anteriormente descritos, porcentaje de positividad en el lugar muestreado, porcentaje de muestras sobre el total de muestras. La flecha indica el comienzo y la dirección de la gráfica, las convenciones negras indican resultados superiores al 50% y las convenciones rojas señalan el mayor porcentaje de muestras tomadas. Fuente: Elaboración propia.

En los 27 lugares muestreados, se aplicó un total de 701 encuestas que incluían datos personales, de residencia y 58 preguntas relacionadas con la enfermedad de Chagas y factores de riesgo asociados a ella (Anexo 12). Las preguntas 39, 40, 41, 42 y 43, incluían datos de los hábitos de almacenamiento, exposición y preparación de diferentes alimentos por lo cual se agruparon y se clasificaron como la variable Riesgo Alimentario (RA), las preguntas 44, 45, 46, 47 y 48 que incluían características de las viviendas como grietas en paredes, pisos y uso de materiales vegetales para su construcción, se agruparon y se clasificaron como Vivienda Precaria (VP) y las preguntas 52, 53, 54, 55, 56 y 57 incluían la convivencia con animales domésticos y la asociación con sitios anexos a la vivienda que permitían el arrume de diferentes materiales o el contacto con animales peridomésticos y silvestres, se agruparon y se clasificaron como Conductas de Riesgo (CR). Se asignó un valor de cero (0) como la no ocurrencia y uno (1) como la ocurrencia de los factores de riesgo.

De las 701 encuestas analizadas, 61 (8,70%) fueron negativas y 640 (91,30%) fueron positivas para CR, 348 (49,64%) fueron negativas y 353 (50,36%) fueron positivas para el RA y 510 (72,25%) fueron negativas y 191 (27,25%) fueron positivas para VP (Anexo 17).

Se realizaron 3 tablas cruzadas para la presencia de muestras positivas y negativas en las diferentes zonas muestreadas de humanos, caninos, triatominos y zangüeyas frente a los factores de riesgo anteriormente mencionados. Con el fin de analizar la probabilidad de que se relacionara la presencia del factor de riesgo con la existencia de muestras positivas en la zona se interpretó la Odds Ratio (OR) o Razón de productos cruzados que implica una asociación positiva para los factores de riesgo con un resultado mayor a 1,0; encontrándose que la ocurrencia de humanos positivos es 1,8 veces mayor en zonas con conductas de riesgo y 2,1 veces mayor cuando se cuenta con una vivienda precaria, la ocurrencia de caninos positivos es 1,9 veces mayor en presencia de conductas de riesgo y 1,5 veces mayor cuando se cuenta con una vivienda precaria, adicional a esto, la presencia de triatominos positivos es 1,4 veces mayor en zonas con conductas de riesgo, 1,3 veces mayor si existe el riesgo alimentario y 2 veces mayor en presencia de una vivienda precaria y la presencia de zangüeyas positivas es 3,3 veces mayor en zonas con conductas de riesgo, 2 veces mayor si existe el riesgo alimentario y 2 veces mayor si se cuenta con una vivienda precaria (Tabla. 9).

**Tabla 9.** Razón de productos cruzados de la no ocurrencia (0) y ocurrencia (1) de Conducta de Riesgo (CR), Riesgo Alimentario (RA) y Vivienda Precaria (VP) en zonas con presencia (SI) o ausencia (NO) de humanos, caninos, triatominos y zangüeyas positivas. P: Porcentaje. Fuente: Elaboración propia.

		CR				RA				VP			
		0	P	1	P	0	P	1	P	0	P	1	P
H	SI	40	11,14%	319	88,86%	181	50,42%	178	49,58%	289	80,50%	70	19,50%
	NO	21	6,50%	302	93,50%	164	50,77%	159	49,23%	214	66,25%	109	33,75%
C		OR		1,8033		OR		0,9859		OR		2,1029	
		L	1,0392	U	3,129	L	0,7299	U	1,3316	L	1,4843	U	2,9793
	SI	3	8,33%	33	91,67%	14	38,89%	22	61,11%	28	77,78%	8	22,22%
	NO	32	7,69%	384	92,31%	217	52,16%	199	47,84%	289	69,47%	127	30,53%
T		OR		1,909		OR		0,5836		OR		1,5381	
		L	0,317	U	3,7537	L	0,2906	U	1,1718	L	0,6822	U	3,4678
	SI	13	9,70%	121	90,30%	77	57,46%	57	42,54%	108	80,60%	26	19,40%
	NO	24	7,21%	309	92,79%	171	51,35%	162	48,65%	222	66,67%	111	33,33%
Z		OR		1,3833		OR		1,2798		OR		2,0769	
		L	0,6822	U	2,8049	L	0,8542	U	1,9175	L	1,2787	U	3,3733
	SI	3	11,11%	24	88,89%	16	52,26%	11	40,74%	20	74,07%	7	25,93%
	NO	5	3,70%	130	96,30%	57	42,22%	78	57,78%	79	58,52%	56	41,48%
		OR		3,25		OR		1,9904		OR		2,0253	
		L	0,728	U	14,5095	L	0,8591	U	4,6116	L	0,802	U	5,1144

## 9. DISCUSION

La enfermedad de Chagas utiliza un ciclo complejo compuesto por un amplio rango de reservorios y vectores implicados en su supervivencia <sup>(1)</sup>. Esta afecta entre 10 a 18 millones de personas en Latinoamérica y 25 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad, característica que la convierte hoy como enfermedad olvidada y desatendida en Colombia y países de América del sur <sup>(2), (3), (4)</sup>.

En Colombia existe escasa información sobre la relación entre las diferentes especies de vectores y aspectos ecoepidemiológicos asociados al ciclo de transmisión de *T. cruzi*. Los programas de control de este país se han centrado en vectores domiciliados mientras que la investigación epidemiológica y científica se ha restringido a la región del Caribe. Por lo tanto, el estudio multidisciplinar de la enfermedad se debe enfocar en la necesidad de conocer el rol que desempeñan en la naturaleza los diferentes reservorios y vectores <sup>(86), (84)</sup>, analizando las tasas de infección, genotipificación de los clones circulantes y fuentes de alimentación con el fin de entender la dinámica de la transmisión del parásito <sup>(64)</sup>.

La Mesa (Cundinamarca) es un municipio de alto riesgo de adquisición de la enfermedad, ya que cuenta con las características geográficas necesarias para el desarrollo del vector y su población se desempeña en un ambiente mayoritariamente rural que introduce al humano como parte activa de la cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas <sup>(9)</sup> <sup>(10)</sup>; sin embargo, esta región específica no ha sido incluida en los estudios epidemiológicos realizados hasta ahora en Colombia <sup>(139)</sup>.

Aunque la transmisión de la enfermedad de Chagas por vectores intradomiciliarios en Colombia es eminentemente rural, hay dos razones que hacen interesante el estudio de zonas peri-urbanas y urbanas. Por un lado, en los últimos años se han reportado varios brotes de transmisión oral de la enfermedad de Chagas en estas zonas donde se instalan ciclos de transmisión silvestre. Por otro lado, el fenómeno de migración de áreas rurales a urbanas, genera un importante aumento de la prevalencia en zonas donde los pacientes pasan desapercibidos frente a la infección y donde podrían favorecerse de una atención temprana para evitar o disminuir las potenciales complicaciones de la enfermedad <sup>(9)</sup>.

Es fundamental, para comprender la ecología de los ciclos de transmisión de *T. cruzi*, tener en cuenta las variables ambientales, las características culturales de las poblaciones locales, silvestres y especies de mamíferos domésticos, composición y especies de triatomíneos para poder aclarar el sistema ecológico responsable del

mantenimiento del parásito en las zonas que se enfrentan a casos o brotes de la enfermedad <sup>(40), (101)</sup>.

Las pruebas diagnósticas son herramientas que emplea el clínico para disminuir o eliminar la incertidumbre acerca del estado de salud o enfermedad en un sujeto particular. Es decir, su objetivo es ayudar a clasificar el verdadero estado o condición del sujeto; sin embargo, esto que suena relativamente sencillo tiene una serie de consideraciones que alcanzan cierta complejidad. El resultado de la prueba diagnóstica depende de diferentes variables relacionadas y no relacionadas con la prueba. Ello implica que el clínico tenga claro cuál es la validez, precisión y rendimiento global de esta, en qué tipo de población fueron descritos sus estimadores, que uso le está dando a la prueba, cual es el resultado que está buscando con ella y en qué condiciones de probabilidad de cierto resultado la está empleando <sup>(19)</sup>.

El diagnóstico en el laboratorio depende de la fase de la enfermedad; si se sospecha la presencia de fase aguda, deben preferirse los test parasitológicos, pues el parásito por definición se encuentra fácilmente detectable. Cuando se trata de confirmar o excluir un individuo con sospecha de fase crónica “que son la mayoría de los casos” se deben preferir los exámenes serológicos, que son más rápidos, económicos y reproducibles. En circunstancias excepcionales como lo son la confirmación parasitológica de un caso de serología dudosa, o la investigación del efecto tripanomicida de una nueva droga, se procede a exámenes parasitológicos de multiplicación, que, a partir de escasos parásitos, promueven su reproducción (hemocultivo y xenodiagnóstico) o la replicación de ácidos nucleicos como en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos tres tipos de exámenes parasitológicos por multiplicación que no son empleados en la rutina diagnóstica, tiene en común las dificultades técnicas y su realización exclusiva en sitios de investigación <sup>(56), (132), (141)</sup>.

La PCR ha sido evaluada recientemente en diferentes estudios y se constituyó como una alternativa diagnóstica, pues identifica directamente el ADN del parásito y su poder de detección es muy alto (1 parásito en 10 cc de sangre). Aunque la prueba no está validada como patrón de oro, tiene la fortaleza de una robusta fundamentación biológica en su origen y proceso que nos permite estar seguros de que un resultado positivo es debido a replicación directa de trazos del ADN específico de *T. cruzi*, además permite la caracterización de la cepa circulante <sup>(58)</sup>. Esto hace improbable las reacciones cruzadas con otras infecciones parasitarias. La capacidad de detección de *T. cruzi* en diferentes estudios de PCR depende del iniciador y varía entre 30% y 65% en sujetos en fase crónica, siendo mayor en poblaciones endémicas <sup>(19), (58), (144)</sup>.

Los porcentajes de positividad encontrados: 1,97% para muestras de humanos y 35,9% para muestras de caninos, fueron establecidos mediante la utilización de métodos serológicos que confirman su diagnóstico, ya que según la OMS, dos pruebas serológicas con diferente principio que se encuentran positivas para la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi*, en este caso ELISA e IFI, afirman la positividad de las muestras<sup>(14)</sup>. Lo que pone en evidencia que tanto humanos como caninos se encuentran en una fase crónica de la enfermedad, pues, aunque fue posible determinar su diagnóstico mediante pruebas serológicas, las pruebas de PCR no generaron amplificación del protocolo utilizado, lo cual demuestra que la carga parasitaria del momento se encontraba para ambos grupos por debajo del límite de detección de la prueba<sup>(100), (131)</sup>.

Los resultados obtenidos de humanos dejan en evidencia que La Mesa no solamente es una zona en alto riesgo para la adquisición de la enfermedad; si no, que en esta se desarrolla el ciclo de transmisión de *T. cruzi*. Los programas institucionales de control vectorial en Colombia, han identificado estudios en diferentes regiones del país que demuestran seroprevalencia en perros superiores al 27%, similares a las encontradas en este estudio; es claro que estos animales con frecuencia son víctimas de la infección y lo más importante portadores de altas parasitemias, lo que mantiene una fuente de amplificación de la infección para los vectores cercanos al animal<sup>(113)</sup>.

Una de las mayores limitaciones de la técnica de PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas es la sensibilidad en la fase crónica debido a la escasez de parásitos circulantes, ya que estos están confinados a los tejidos, por otro lado, es importante resaltar que en la sensibilidad de la PCR también influye el método y el volumen de sangre empleados para la extracción de ADN, los primers utilizados y la secuencia diana; por lo cual su uso en el diagnóstico clínico requiere la estandarización y validación de los protocolos en cada laboratorio<sup>(3), (8), (90), (158)</sup>.

Aunque las secuencias dianas mostradas en este estudio tienen un alto número de copias del genoma de *T. cruzi* los resultados mostraron bajos o nulos valores de sensibilidad y calidad para ensayos en estas muestras<sup>(144)</sup>. Esto demuestra que pacientes con un resultado positivo de PCR pueden ser diagnosticados como infectados con *T. cruzi*, pero para los pacientes con un resultado PCR negativo será necesario el uso de cualquiera de las otras pruebas para realizar el diagnóstico. Esto indica que las pruebas moleculares pueden confirmar el diagnóstico, pero no excluirlo<sup>(34), (144)</sup>.

Los métodos actualmente disponibles para el diagnóstico genotipo específico de *T. cruzi* presentan distintos niveles de complejidad pues no puede ser realizados directamente en las muestras biológicas y clínicas, requieren del aislamiento del parásito por cultivo o xenodiagnóstico seguido del crecimiento y mantenimiento in vitro del parásito que puede

conducir a la selección clonal; se sabe además, que la parasitemia en pacientes y reservorios de *T. cruzi* es variable y que el éxito de aislamiento del parásito es dependiente de la parasitemia del huésped <sup>(78)</sup>. La sensibilidad del diagnóstico puede ser mejorada mediante la maximización de la cantidad de ADN diana en la alícuota utilizada para la extracción de ADN <sup>(159)</sup>.

Las especies de triatomíneos encontradas en este estudio son consideradas vectores secundarios para la transmisión de la enfermedad. Estudios realizados en La Mesa (Cundinamarca) hallaron *P. geniculatus* infectados con *T. cruzi*. Aunque *R. colombiensis* es un vector ya identificado en esta zona no existen reportes que confirmen su infección natural con *T. cruzi*, hecho claramente encontrado en este estudio <sup>(67)</sup>. Un estudio anterior realizado en la región caribeña de Colombia, mostró que los vectores secundarios juegan un papel importante en los diferentes ciclos de transmisión epidemiológicos de *T. cruzi* y se demostró que la frecuencia de pacientes con serología positiva en la presencia de vectores silvestres es similar a la frecuencia en la presencia de vectores internos <sup>(64), (70)</sup>. Razón por la cual sigue siendo necesaria la comprensión del papel que juegan los triatomíneos en áreas silvestres y su relación con las comunidades de la región <sup>(140)</sup>.

*P. geniculatus* es el triatomíneo más distribuido en América Latina del género *Panstrongylus*. En Colombia esta especie se registra en 25 departamentos, incluyendo al departamento de Cundinamarca. Este vector se considera de hábitos silvestres ya que habita en madrigueras asociadas principalmente con armadillos, zarigüeyas, roedores y murciélagos. No obstante, se ha demostrado la intrusión de *P. geniculatus* adultos en hábitats domésticos, colonización que puede deberse a los cambios generados por la construcción de viviendas y la alteración de los ecosistemas y/o por la atracción generada por la luz artificial <sup>(36), (64)</sup>.

La presencia de ninfas y adultos de Triatomíneos en viviendas de “buena calidad”, deja nuevas hipótesis para replantear el concepto de “la casa enferma”, descrito por el escritor venezolano Roberto Briceño-León en su libro “La Casa Enferma: Sociología de la Enfermedad de Chagas” publicado en 1990 para mostrar entre otros aspectos la pobreza como una condición objetiva de los trabajadores rurales que determina el tipo de vivienda y modo de transmisión de la enfermedad <sup>(140)</sup>.

Los resultados de positividad obtenidos para triatomíneos muestran que la PCR tuvo un rango de detección más amplio que el examen en fresco puesto que 41 (58,57%) triatomíneos fueron encontrados positivos con este método, mientras que solo 23 (32,86%) triatomíneos se encontraban positivos para el examen en fresco.

La utilización de técnicas moleculares como la PCR mejora la sensibilidad, respecto al examen directo, de un 32% a un 50% <sup>(50), (90)</sup>. El examen en fresco presenta una sensibilidad menor al 50 % para un solo examen, lo que implica que para aumentar su sensibilidad se debe repetir varias veces. Por otro lado, la PCR tiene diferentes blancos como lo son el ADN nuclear y el ADN del kinetoplasto (ADNk) que presentan grandes copias de la secuencia a amplificar y que, por lo tanto, cuando la cantidad de parásitos presentes en la muestra es alta, aumenta la sensibilidad de la técnica <sup>(11)</sup>.

Sin importar el ambiente en el que los triatomíneos fueron capturados, existe un predominio del DTU I en las diferentes muestras analizadas frente a otros DTUs puesto que de 41 triatomíneos positivos para PCR, 30 (73,20%) tenían presencia del DTU I y 11 (26,80%) para otras DTUs. Esto podría asociarse a que los triatomíneos silvestres aunque pueden usar una fuente de alimentación doméstica prefieren el consumo de sangre de animales silvestres, lo cual explica la detección del DTU I (silvestre) <sup>(64)</sup>. La caracterización de *T. cruzi* mediante el uso de las secuencias del gen del minixón y los análisis del microsatélite, son importantes porque diferencian las características biológicas de las cepas <sup>(154)</sup>.

TcI es el mayor causante de enfermedad de Chagas y el DTU más extendido de la naturaleza, presente en el continente americano <sup>(9), (115), (41)</sup>; las teorías sugieren que evolucionó junto con los marsupiales, encontrando prevalencias de 39,5% para *Didelphis marsupialis* <sup>(36), (84)</sup>. En Colombia el subgrupo predominante es TcI, el cual ha sido asociado a las patologías de la enfermedad de Chagas con grandes implicaciones epidemiológicas; sin embargo, TcII, TcIII y TcIV también pueden ser encontrados en bajas proporciones o en co-infecciones de pacientes <sup>(160)</sup>. Prevalencias detectadas en Colombia demuestran resultados similares para la presencia del DTU I encontrados en este estudio, TcI 67,8%, TcII 6,7%, TcIII 8,7%, TcIV 4,0%, TcV 6,0% <sup>(64), (117)</sup>.

Las muestras positivas para otros DTUs fueron asociadas como un posible DTU II ya que este se encuentra ampliamente asociado a ciclos domésticos. En Colombia los parásitos circulantes pertenecen a TcI, pero hay evidencias de pacientes infectados con TcII <sup>(115)</sup>. Este hecho podría afectar a la sensibilidad de la PCR debido a los cambios en la secuencia y el número de copias visto en los parásitos según los cebadores utilizados; Virreira y col, observan que la intensidad de las bandas de ADN puede variar según el linaje genético de *T. Cruzi* con los cebadores utilizados para la detección de ADNk <sup>(115)</sup>.

Debido al submuestreo de huéspedes y hábitats, la ecología de los DTUs de *T. cruzi* está lejos de ser bien entendida, pues los métodos moleculares requieren una carga parasitaria medible para identificar directamente los DTUs de *T. cruzi* en muestras <sup>(78)</sup>. Reservorios silvestres de la enfermedad pueden variar ampliamente el rendimiento diagnóstico, dependiendo del tipo de PCR <sup>(142)</sup>. En este sentido, se ha sugerido que el

flujo genético de *T. cruzi*, en el ambiente selvático podría estar determinado por la diversidad de hospederos, los cuales estarían ejerciendo una presión de selección, de tipo desconocido sobre las poblaciones naturales del parásito <sup>(9), (121)</sup>.

No cabe duda, que este parásito presenta una gran plasticidad y por lo tanto tiene la capacidad de generar una diversidad muy grande de clones con características muy diferentes entre ellas, lo que posiblemente le permita como especie adaptarse a sus diferentes hospederos <sup>(44)</sup>. El genotipo de *T. cruzi* presente en este estudio es típico del ciclo silvestre pues en el escenario las viviendas generalmente se encuentran cercanas a un bosque y así la riqueza de la biodiversidad de mamíferos selváticos y triatomíneos, mantiene la circulación de este genotipo en el medio ambiente <sup>(33)</sup>.

Sin duda alguna las zarigüeyas presentaron el porcentaje de positividad más alto para la presencia de anticuerpos de tipo contra *T. cruzi*, se encontraron 16 de 27 especímenes capturados de *Didelphis marsupialis* positivos es decir 59,3%; resultados similares son reportados por Schweigman y col., donde 47% de 69 ejemplares capturados presentan positividad para *T. cruzi* <sup>(46)</sup>. Se reportan datos de Seroprevalencia en zarigüeyas que varían del 2% al 62% <sup>(57)</sup>. Lo que la convierte no solo en un reservorio de la enfermedad sino en un posible vector de esta.

Para considerar un animal como sostenedor del parásito se tienen en cuenta los siguientes aspectos:

- Se encuentra en un nivel intermedio de la cadena trófica por lo que depende de sus relaciones con otras especies.
- En otro tiempo fueron cazados por su aprovechamiento para pieles y en la actualidad su caza tiene como objetivo el aprovechamiento de su carne por su apariencia y sabor a pollo.
- Algunas especies no suelen acercarse a zonas pobladas <sup>(11)</sup>.

Se cree que los marsupiales fueron los primeros reservorios ancestrales del parásito sugiriendo que la evolución y propagación de estas especies dio como resultado el origen a las DTUs ancestrales proponiendo a las especies de *D. marsupialis* como reservorio natural para el linaje 1 <sup>(84), (161)</sup>. Estudios parasitológicos muestran que desde muy pequeñas las zarigüeyas resisten a infecciones experimentales con artos inóculos ocurriendo los dos tipos de infección:

- Aparentemente autocurado, donde los resultados en sub-inoculación en ratones y xenodiagnóstico se convierten pocas semanas después y la prueba de inmunofluorescencia es positiva a títulos bajos y sin invasión de las glándulas <sup>(48)</sup>.

- La infección en donde los parásitos a menudo se recuperan de forma intermitente, a través de xenodiagnóstico y/o hemocultivo después de muchos meses, la inmunofluorescencia es positiva a altos títulos y la mayoría de los animales presenta parásitos en las glándulas odoríferas <sup>(48)</sup>.

Diferentes estudios asocian a los triatomíneos encontrados como *P. geniculatus* con la transmisión de *T. cruzi* posiblemente proveniente de *D. marsupialis*; en Colombia se encontraron 2 muertes de 10 casos en Lebrija Santander por *P. geniculatus* asociado con *D. marsupialis*, 1 muerte de 5 casos en Bucaramanga Santander por *P. geniculatus* y *R. Pallensces* asociados a *D. marsupialis*, 0 muertes de 5 casos en Piedecuesta Santander por *P. geniculatus* asociado a *D. marsupialis*, 1 muerte de 11 casos en Turbo Antioquia por *P. geniculatus* asociado a *D. marsupialis* y 0 muertes de 3 casos en San Vicente de Chucuri Santander por *P. geniculatus* y *R. pallensces* asociado a *D. marsupialis*, pues las manifestaciones clínicas de los parásitos provenientes de estas asociaciones son mucho más fuertes y se caracterizan como fase hiperaguda <sup>(15), (36)</sup>.

El análisis de factores de riesgo con la razón de productos cruzados reveló, que la ocurrencia de humanos positivos es 1,8 veces mayor en zonas con conductas de riesgo y 2,1 veces mayor cuando se cuenta con una vivienda precaria, la ocurrencia de caninos positivos es 1,9 veces mayor en presencia de conductas de riesgo y 1,5 veces mayor cuando se cuenta con una vivienda precaria, adicional a esto, la presencia de triatomíneos positivos es 1,4 veces mayor en zonas con conductas de riesgo, 1,3 veces mayor si existe el riesgo alimentario y 2 veces mayor en presencia de una vivienda precaria y la presencia de zangüeyas positivas es 3,3 veces mayor en zonas con conductas de riesgo, 2 veces mayor si existe el riesgo alimentario y 2 veces mayor si se cuenta con una vivienda precaria. Estos factores de riesgo han sido reportados en diferentes estudios que avalan lo encontrado y asociado por la razón de productos cruzados.

Es bien sabido que la enfermedad de Chagas se considera una enfermedad desatendida ya que se produce principalmente en las zonas más pobres y rurales de América Latina <sup>(13), (139)</sup> y que está estrechamente relacionada con las bajas condiciones socioeconómicas en zonas endémicas. Casas sucias, mal iluminadas, construidas de adobe, carrizo, barro o de caña, techos de hoja de palmera o de paja, con numerosas grietas en las paredes o tabiques y con un gran número de objetos domésticos acumulados, gallineros, pilas de leña y arrumes de piedras o ladrillos, ofrecen excelentes lugares de refugio y de reproducción de especies de *Triatoma* y *Panstrongylus* <sup>(5), (9), (13), (19), (118), (129)</sup>.

La enfermedad también ha sido relacionada con las dificultades socioeconómicas de una comunidad, sus condiciones de vivienda, el acceso a la educación, bajos niveles de

salubridad, escasos servicios de acueducto y alcantarillado, pocas posibilidades de manejo adecuado de residuos y bajo nivel de acceso a los servicios públicos domiciliarios, los movimientos migratorios <sup>(24), (27), (18)</sup>, , especialmente la migración humana de otras áreas endémicas llevando reservorios domésticos y vectores infectados con *T. cruzi*, la urbanización desorganizada, la deforestación y la irrupción de los ciclos silvestres, son elementos que explicarían la emergencia y re-emergencia de la enfermedad de Chagas <sup>(3), (37), (61), (71)</sup>.

Cada familia normalmente habita con al menos un perro que además de ser alimento para los insectos hematófagos atrae triatominos a las viviendas y puede presentarse como factor de riesgo lo que muestra que la probabilidad de estar infectado por *T. cruzi*, si se convive con animales infectados, es de tres a cinco veces mayor en comparación con individuos que viven con animales sin infección <sup>(44), (65), (66), (162)</sup>.

En este sentido se considera que el perro es un agente amplificador, es decir, es un mamífero que convive o habita en cercanía con los seres humanos, no tiene capacidad para evitar la picadura de los triatominos a la vez que estos mismos podrían picar al ser humano en el mismo hábitat o en uno muy próximo, circunstancia que otorga prioridad epidemiológica a los perros respecto a otros animales silvestres <sup>(66)</sup>. Se estima que un perro positivo para infección puede infectar a un triatomo por día; sin embargo, esto varía de acuerdo a la condición del cuerpo del perro, las coinfecciones, la historia de la infección, la competencia del vector, la cantidad de alimento que el vector pueda ingerir y la duración de este al succionarla y procesarla <sup>(128)</sup>.

Es un fenómeno regional, la presencia de muros, corrales, gallineros, chiqueros, galpones, establos, embarcaderos de ganado y perreras construidos con paredes de piedra en bruto anexas a la vivienda tradicional, característica que a largo plazo se traduce en un factor de riesgo para el aumento de la colonización de triatominos <sup>(8)</sup>.

Actualmente, la transmisión del patógeno ha tenido relevancia por el hallazgo en alimentos que han generado los últimos brotes. Aún no se ha identificado un alimento específico implicado en la transmisión de la enfermedad, pero sí se tiene en cuenta que tanto carnes como jugos han sido los responsables de los casos reportados por vía oral <sup>(33)</sup>. Por lo tanto, se requiere más investigaciones en cuanto a posibles alimentos implicados, hábitos alimentarios, técnicas para estudio de tripanosomas en alimentos, reservorios y otras rutas de transmisión <sup>(18), (30)</sup>.

Las funciones de las diferentes especies de mamíferos en el mantenimiento del parásito no son constantes en función del tiempo o de la región. A pesar de la gran cantidad de especies de mamíferos que son naturalmente infectados por *T. cruzi*, cada especie juega

un papel importante bien sea en la dispersión o en el mantenimiento del parásito. Esta variación se debe a las interrelaciones ecológicas y la alta velocidad con que el hombre modifica ambientes <sup>(101)</sup>. Sin la vigilancia de poblaciones salvajes, no se puede evaluar con precisión el riesgo de transmisión al mamífero peridoméstico circundante y a las poblaciones humanas <sup>(103)</sup>.

El humano, el perro y la zarigüeya son los reservorios más importantes para *T. cruzi* en los respectivos ciclos, se ha comprobado que los animales son 14 veces más infectivos para propagar la enfermedad y en los animales silvestres la enfermedad transcurre de forma clínicamente inaparente, como se pudo observar en la zarigüeyas que se encontraban a excepción de 2 en buena condición corporal <sup>(11), (29)</sup>. La infección y/o enfermedad es el resultado de muchos factores relacionados con el huésped y el parásito en consecuencia de la interacción de las diferentes subpoblaciones en un entorno <sup>(40), (77), (101)</sup>. Cada situación epidemiológica de la tripanosomiasis es única en un determinado rango de espacio y tiempo, por lo tanto, las generalizaciones en las medidas de control pueden ser ineficientes <sup>(11)</sup>.

La pérdida de diversidad de pequeños mamíferos silvestres aumenta las tasas de infección, por ende, el mantenimiento de la biodiversidad es uno de los más eficientes mecanismos para la generación de una enzootia, lo que conlleva a la reemergencia de casos nuevos en humanos <sup>(11), (40), (74), (101)</sup>. Aún si existiera la posibilidad de eliminar todas las infecciones humanas, la enzootia permanecería como una permanente amenaza potencial en sus hospedadores y reservorios silvestres <sup>(12)</sup>.

El hecho de que la enfermedad de Chagas se de en zonas donde hay un importante solapamiento entre la fauna silvestre, el ganado, los animales domésticos y diversas actividades humanas, más el incremento de las áreas rurales poco degradadas hace que los estudios silvestres de este tipo de zoonosis sean de gran importancia para la salud pública <sup>(12)</sup>.

La existencia de focos enzoóticos tiene grandes retos, ya que estos pueden permanecer no reconocidos por largos periodos de tiempo, lo que constituye zonas silenciosas del patógeno que representan una amenaza epidemiológica potencial <sup>(12)</sup>. No obstante, la infección antroponozootica implica que los casos humanos ocurran de forma esporádica o eventual por diversos mecanismos, como la intrusión de vectores en el domicilio o por su actividad en el extradomicilio, ambos asociados a los ciclos silvestres, sin colonización en el domicilio por los vectores <sup>(36)</sup>. Por último, los ciclos de transmisión de *T. cruzi* son sistemas complejos debido a su no linealidad, la imprevisibilidad y la naturaleza multivariable. El examen de las interacciones huésped-parásito es la forma más adecuada para comprender la epidemiología de ciclos de transmisión <sup>(31)</sup>.

## 10. CONCLUSIONES

La seropositividad encontrada en los humanos, caninos, triatominos y zarigüeyas examinados es una señal de alerta para las autoridades sanitarias de las zonas endémicas en el departamento de Cundinamarca.

Es de vital importancia reconocer el peligro que corren los hábitats silvestres debido a las grandes actividades agropecuarias desarrolladas, que de cierta forma contribuyen a que los triatominos invadan sitios domésticos o peridomésticos en busca de refugio y fuentes de alimentación. La existencia de mamíferos silvestres como zarigüeyas, macacos, armadillos o roedores como reservorios de *T. cruzi*, implica una fuente no controlada de parásitos que pueden reintroducir la infección en zonas domésticas ya controladas o definitivamente interrumpidas.

Cuando el hombre penetra en los focos naturales, su acción sobre los ecótopos silvestres fue tan devastadora por la quema y tala de bosques, la construcción de viviendas con material vegetal y la caza indiscriminada de los animales silvestres, que realizó una modificación en muchas zonas del país y adaptando así especies silvestres de triatominos a condiciones artificiales.

La eliminación, entendida como una interrupción definitiva de la transmisión, continuará siendo un objetivo inalcanzable a corto plazo a menos que se erradique la pobreza y se mejoren las condiciones de vida de tanto en América Latina, como en diferentes regiones del país, entre estas La Mesa (Cundinamarca); otra opción sería la vigilancia entomológica y el mantenimiento de las medidas de control.

En Colombia existe un déficit en la producción académica en este tema, por ello regiones como La Mesa (Cundinamarca) se convierten en un escenario propicio para una revisión de las estrategias que han mostrado eficiencia en países y contextos similares.

Los porcentajes de positividad para los diferentes grupos de animales y humanos analizados dejan en evidencia que, aunque La Mesa (Cundinamarca) no es una región confirmada como endémica para la enfermedad de Chagas, y a la fecha no cuenta con reporte de casos confirmados para infección por *T. cruzi*, si existe un ciclo de transmisión que involucra tanto al vector como diferentes hospederos (Humano, perro y zarigüeya).

Las técnicas moleculares mostraron una gran utilidad para el diagnóstico en triatominos al ser mucho más sensibles y específicas que el examen en fresco; sin embargo, este tipo de técnicas requieren el manejo de muestras con alta carga

parasitaria para obtener un resultado positivo, hecho que dificulta el análisis del clon existente en las muestras recolectadas, puesto que una opción para la amplificación del número de parásitos existentes como el cultivo de estas muestras, induce una selección clonal del parásito impidiendo así un adecuado análisis de los clones circulantes en esta región.

El predominio del DTUI en las muestras analizadas indica el establecimiento y mantenimiento de un posible ciclo de transmisión de origen silvestre, ya que este clon de *T. cruzi* predomina en mamíferos selváticos y se atribuye mayoritariamente a la transmisión por *D. marsupialis*; No obstante, en La Mesa (Cundinamarca) existe otro tipo de clon que aunque no pudo ser identificado se atribuye al DTUII puesto que es el otro clon reportado en Colombia y caracterizado por mantenerse en el ciclo doméstico.

Los hallazgos generales reportados por este estudio plantean un modelo para el análisis del comportamiento de los diferentes ciclos de transmisión que configuran el mantenimiento y la aparición del ciclo epidemiológico de la enfermedad de Chagas en zonas endémicas y no endémicas del país, En donde se reconoce la importancia de abarcar, estudiar y tratar este fenómeno como un ciclo complejo en donde actúan tanto el vector como los diferentes hospederos y sus factores de riesgo para mantener de manera activa la infección en lugares endémicos del país o trasladar así está a nuevas zonas consideradas como de bajo riesgo de transmisión de la enfermedad.

## 11. RECOMENDACIONES

A nivel de la salud pública, es necesario e importante ampliar los diálogos entre la población afectada, en riesgo y aquellas instituciones encargadas de la prevención de la enfermedad de Chagas, con el fin de ampliar de una forma activa el conocimiento la enfermedad, su diagnóstico y tratamiento, generando así el planteamiento de posibles soluciones rápidas y oportunas. En este estudio se hace un llamado de alerta a las entidades nacionales de salud para la actualización de los datos epidemiológicos en La Mesa (Cundinamarca) y que se proponga ante el Ministerio de Salud y Protección Social programas de vigilancia entomológica de los vectores y reservorios presentes en la zona.

Esta enfermedad debe ser estudiada de manera amplia y multidisciplinar para la elaboración de estrategias de control y de vigilancia epidemiológica, lo que implica el conocimiento de la diversidad de mamíferos de la zona (potenciales reservorios del parásito), las peculiaridades de la interacción huésped-parásito (incluyendo las características ecológicas de cada uno) y los factores que pueden favorecer el contacto entre los mamíferos y los vectores infectados, que en última instancia modulan la dinámica de la transmisión de *T. cruzi* y el riesgo que implicaría la presencia de estos reservorios en áreas cercanas a las viviendas humanas, asociado con ciertas costumbres de la comunidad, como la caza, el consumo de animales silvestres y el consumo de alimentos contaminados <sup>(40), (41)</sup>.

La complejidad en el diagnóstico y la evaluación de tratamiento, impone la necesidad de métodos que puedan ofrecer mayor sensibilidad y especificidad para los diferentes contextos clínicos y epidemiológicos, y que permitan diagnósticos oportunos, vigilancia epidemiológica, tamizaje seguro en bancos de sangre y evaluación de las posibles terapias.

A partir de este trabajo se abren las puertas para nuevos estudios que involucren el control y la vigilancia vectorial, las manifestaciones cardiopáticas en la población, el screening serológico de sus habitantes y la construcción de una visión epidemiológica de esta región, o la implementación de este o un modelo similar en distintas regiones del país.

## **ANEXOS**

### **ANEXO 1. Extracción del ámpula rectal en triatominos vivos**

1. Refrigerar el triatomino en una caja de Petri a 4°C por 5 minutos.
2. Visualizar con la ayuda de un estereoscopio, para clasificarlo morfológicamente.
3. Sujetar con pinzas la parte dorsal del triatomino mientras se extrae el ámpula rectal y se deposita en un tubo eppendorf debidamente esterilizado.
4. Resuspender en 200 ul de PBS tibio.
5. Dejar a 4°C para extracción de ADN.

### **Extracción del ámpula rectal en triatominos muertos**

1. Colocar el triatomino en una caja de Petri y visualizar con ayuda de un estereoscopio.
2. Inyectar con jeringa de insulina 0,5 ml de PBS (acondicionado a 37° C) en el abdomen del triatomino.
3. Incubar 15 minutos a 37° C.
4. Si es necesario, realizar nuevamente la rehidratación, hasta que el abdomen se encuentre blando.
5. Sujetar con pinzas la parte dorsal del triatomino mientras se extrae el ámpula rectal y se deposita en un tubo eppendorf debidamente esterilizado.
6. Resuspender en 200 ul de PBS.
7. Dejar a 4°C para extracción de ADN.

Protocolo establecido por el laboratorio de Medicina Veterinaria de la Universidad Antonio Nariño.

## **ANEXO 2. Protocolo de extracción ADN sangre total por fenol cloroformo**

1. Extraer por punción venosa entre 3 y 5 ml de sangre en tubo con anticoagulante (EDTA).
2. En un tubo falcon de 15ml, adicionar 500 ul de sangre total más 1000 ul de agua destilada fría, hacer vórtex y centrifugar 1 minuto a 13,000 rpm.
3. Repetir el paso 2 el número de veces que sea necesario para disminuir al máximo la presencia de glóbulos rojos.
4. Descartar el sobrenadante
5. Al pellet limpio adicionar 500 ul de buffer lisis y 3 ul de Proteinasa K.
6. Incubar toda la noche a 37° C o 2 horas a 56 ° C.
7. Adicionar 200 ul de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).
8. Hacer vórtex hasta obtener una solución con aspecto lechoso y centrifugar 1 minuto a 13,000 rpm.
9. Pasar el sobrenadante a tubo eppendorf nuevo.
10. Adicionar el mismo volumen existente de muestra en cloroformo: isopropanol (1:1).
11. Hacer vórtex y centrifugar 30 segundos a 13,000 rpm.
12. Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
13. Adicionar etanol absoluto frio dos veces el volumen que se tiene y 3 ul de cloruro de sodio 1 M.
14. Mezclar por inversión.
15. Dejar 1 hora a -20° C o toda la noche a 4° C.
16. Centrifugar 3 min a 13,000 rpm.
17. Descartar el sobrenadante.
18. Adicionar 500 ul de etanol al 70% frío, hacer inversión.
19. Centrifugar 3 minutos a 13,000 rpm.
20. Descartar el sobrenadante, hacer inversión.
21. Adicionar 500 ul de etanol al 70 % frio.
22. Centrifugar 3 minutos a 13,000 rpm.
23. Descartar el sobrenadante.
24. Secar el pellet 1 hora a 56° C (destapando los tubos eppendorf y manteniendo el baño serológico abierto).
25. Adicionar 300 ul de agua tipo PCR y dejar 15 minutos a 37° C.
26. Atemperar 10 minutos.
27. Guardar a 4° C.

### Buffer de lisis:

10 mM (0.01 M) Tris-Cl (pH 8.0) para 1,000 ml 1.21 g

0.1M EDTA (pH 8.0) para 100 ml 29.224 g

10% (w/v) SDS para 1,000 ml 50 ml

Mezclar y almacenar a temperatura ambiente

Referencia: Sam y Rusell. Molecular Cloning. A laboratory manual <sup>(163)</sup>.

### **ANEXO 3. Protocolo extracción ADN insectos fenol cloroformo**

1. A partir del ámpula rectal y/o partículas de insectos resuspendidas en 200 ul de buffer PBS, centrifugar de 5 a 10 minutos a 13,000 rpm y descartar el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet limpio en 100 ul de buffer lisis (ver preparación del buffer lisis en el anexo 3) y macerar vigorosamente.
3. Adicionar 400 ul de buffer lisis y 3 ul de proteinasa K
4. Incubar 2 horas a 56° C o toda la noche a 37° C.
5. Adicionar 200 ul de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1).
6. Hacer vórtex hasta obtener una solución con aspecto lechoso y centrifugar 1 minuto a 13,000 rpm.
7. Pasar el sobrenadante a tubo eppendorf nuevo.
8. Adicionar el mismo volumen existente de muestra en cloroformo: isopropanol (1:1).
9. Hacer vórtex y centrifugar 30 segundos a 13,000 rpm.
10. Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
11. Adicionar etanol absoluto frio dos veces el volumen que se tiene y 3 ul de cloruro de sodio 1 M.
12. Mezclar por inversión.
13. Dejar 1 hora a -20° C o toda la noche a 4° C.
14. Centrifugar 3 min a 13,000 rpm.
15. Descartar el sobrenadante.
16. Adicionar 500 ul de etanol al 70% frío, hacer inversión.
17. Centrifugar 3 minutos a 13,000 rpm.
18. Descartar el sobrenadante, hacer inversión.
19. Adicionar 500 ul de etanol al 70 % frio.
20. Centrifugar 3 minutos a 13,000 rpm.
21. Descartar el sobrenadante
22. Secar el pellet 1 hora a 56° C (destapando los tubos eppendorf y manteniendo el baño serológico abierto).
23. Adicionar 300 ul de agua tipo PCR y dejar 15 minutos a 37° C.
24. Atemperar 10 minutos.
25. Guardar a 4° C.

Referencia: Sam y Rusell. Molecular Cloning. A laboratory manual <sup>(163)</sup> .

#### **ANEXO 4. Limpieza ADN insectos por lana de vidrio**

1. Posterior a la extracción de ADN para muestras del ámpula rectal.
2. Preparar un gel de agarosa al 1.5 %.
3. Caliente hasta ebullición y disolución completa de la agarosa.
4. Enfríe hasta aproximadamente 37°C.
5. Adicione 0.75 ul de SYBR-Safe DNA gel stain (1 ul por cada 40 ml) y agite suavemente.
6. Alistar la cámara de acuerdo al ensamblaje descrito en el protocolo de uso de la cámara de electroforesis.
7. Agregar la solución con agarosa en el soporte con el peine para pozos (utilice el peine deseado de acuerdo al número de pozos necesarios).
8. Deje solidificar de 15 a 20 minutos.
9. Retire el peine cuidadosamente y llene la cámara de electroforesis con TBE 0.5 X.
10. Sirva las muestras teniendo la precaución de no contaminar los pozos contiguos.
11. Sirva en una placa de terasaki 2 ul de Blue Juice para cada muestra y mezcle de manera individual con 6 ul de cada muestra y sirva en el gel.
12. Corra las muestras ajustando los amperios de manera constante.
13. Ajuste el equipo a 100 v, 50mA y 250 Wats hasta que el frente de corrido llegue a un cuarto del gel. Aproximadamente 20 minutos.
14. Evidenciar en transiluminador y cortar las bandas fuera de este.
15. En un tubo eppendorf de 1 ml realizar un agujero con una aguja en la parte inferior del tubo y adicionar lana de vidrio para la formación de un tapón en la parte inferior de este (tener precaución al manipular este reactivo).
16. Poner la banda cortada en el eppendorf que posee las especificaciones anteriores
17. Introducir el tubo anterior en un tubo eppendorf de 1,5 mL (cortar la tapa del tubo interno) y tapar.
18. Centrifugar 3 minutos a 13,000 rpm
19. Recuperar el líquido (ADN) del tubo eppendorf de 1,5 mL con una micropipeta y dispensarlo en otro tubo nuevo previamente rotulado.
20. Si aún quedan restos del gel en el tubo eppendorf de 1 mL, centrifugar nuevamente 3 minutos a 13.000 rpm y recuperar el líquido.
21. Almacenar en nevera a 4°C o -20°C, dependiendo de su uso.

Protocolo establecido por el laboratorio de Medicina Veterinaria de la Universidad Antonio Nariño.

## **ANEXO 5. Protocolo de limpieza y purificación para ADN mediante la utilización de Kit Purelink™ viral RNA/DNA kit**

1. Pasar la muestra de ADN a un tubo eppendorf con columna de limpieza y tubo de colección.
2. Centrifugar 1 minuto a 8,460 rpm o 6,800 g.
3. Descartar el contenido del tubo de colección.
4. Preparar el buffer de lavado con 15 ml de este y 60 ml de etanol al 96%; agregar 500 ul del buffer preparado al contenido del tubo.
5. Centrifugar 1 minuto a 8,460 rpm o 6,800 g.
6. Descartar el contenido del tubo de colección.
7. Repita los pasos 4, 5 y 6 una vez más.
8. Centrifugar 1 minuto a 8,460 rpm o 6,800 g para remover los residuos existentes del buffer de lavado.
9. Pasar la columna de limpieza a otro tubo de colección.
10. Eluir con 50 ul de agua estéril libre de RNAsas.
11. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente
12. Centrifugar la columna 1 minuto a 8,460 rpm o 6,800 g para que los ácidos nucleicos desciendan de la columna y se mezclen con el eluyente.
13. Guardar a 4° C.

Protocolo perteneciente al Kit Purelink™ viral RNA/DNA kit

## ANEXO 6. Protocolo de amplificación de PCR para cebadores LCO – HCO

LCO 1490: 5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3'  
 HCO 2198: 5'- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA -3'

1. De acuerdo a la tabla N.1 calcular: 1) la cantidad de muestras a utilizar, incluyendo el control positivo y control negativo 2) las cantidades necesarias para preparar la mix, teniendo en cuenta el número de muestras.
2. Descongelar y hacer spin previo uso de los reactivos, exceptuando la Taq Polimerasa.
3. Preparar la mix, adicionando los reactivos en el siguiente orden: Buffer (incluye MgCl<sub>2</sub> 1,8 mM), dNTPs, primers y agua tipo PCR; usando puntas con filtro para evitar contaminación.
4. Adicionar finalmente la Taq Polimerasa, teniendo la precaución de tenerla el menor tiempo posible fuera de congelación. Hacer spin previo uso.
5. Dispensar en los tubos o en la placa, la mix usando puntas sin filtro, restando la cantidad de ADN que se va a adicionar (13 uL a cada uno).
6. Adicionar 2 uL de ADN (o cantidad necesaria de acuerdo a la concentración de ADN presente en cada muestra, nivelando las muestras de la misma cantidad para una sola mix) a cada tubo o placa y mezcle la mix individualmente.
7. Configurar y correr el termociclador de la siguiente manera: Desnaturalización 94°C – 1 minuto, amplificación de 40 ciclos (94°C – 1 minuto, 45°C – 2 minuto, 72°C – 3 minuto) y extensión final de 68°C – 5 minutos. Teniendo un tiempo total de corrido de 4 horas: 6 minutos.
8. Guarde en refrigeración los amplificados para realizar la electroforesis en agarosa al 2%. El tamaño de banda esperado es de 710pb.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL PARA VOLUMEN FINAL DE 15 uL	CANTIDAD PARA UNA MUESTRA, A VOLUMEN FINAL DE 15 uL
Buffer	5 X	1 X	3 uL
dNTPs	10 mM (10000uM)	0,2 mM (200uM)	0,3 uL
Primers Forward	10 uM	0,2 uM	0,3 uL
Primers Reverse	10 uM	0,2 uM	0,3 uL
Taq Polimerasa	5 U/ml	0.025 U/ml	0,075 uL
Agua tipo PCR	/	/	9,025 uL
ADN	/	/	2 uL

Tabla N<sup>o</sup> 1. Preparación de la mix.

Referencia: CMarZ Barcoding Association, CMarZ mtCOI Barcoding Protocol, Ann Bucklin, University of Connecticut, USA <sup>(164)</sup>.

## ANEXO 7. Protocolo de amplificación de PCR para cebadores S35 y S36

S35: 5'- AAA TAA TGT ACG GGT GGA GAT GCA TG -3'

S36: 5'- GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT -3'

1. De acuerdo a la tabla N.1 calcular: 1) la cantidad de muestras a utilizar, incluyendo el control positivo y control negativo 2) las cantidades necesarias para preparar la mix, teniendo en cuenta el número de muestras.
2. Descongelar y hacer spin previo uso de los reactivos, exceptuando la Taq Polimerasa.
3. Preparar la mix, adicionando los reactivos en el siguiente orden: Buffer (incluye MgCl<sub>2</sub> 1,8 mM), dNTPs, primers y agua tipo PCR; usando puntas con filtro para evitar contaminación.
4. Adicionar finalmente la Taq Polimerasa, teniendo la precaución de tenerla el menor tiempo posible fuera de congelación. Hacer spin previo uso.
5. Dispensar en los tubos o en la placa, la mix usando puntas sin filtro, restando la cantidad de ADN que se va a adicionar (13 uL a cada uno).
6. Adicionar 2 uL de ADN (o cantidad necesaria de acuerdo a la concentración de ADN presente en cada muestra, nivelando las muestras de la misma cantidad para una sola mix) a cada tubo o placa y mezcle la mix individualmente.
7. Configurar y correr el termociclador de la siguiente manera: Desnaturalización 94°C – 1 minuto, amplificación de 30 ciclos (95°C – 1 minuto, 60°C – 1 minuto, 72°C – 1 minuto) y extensión final de 68°C – 5 minutos. Teniendo un tiempo total de corrido de 1 hora: 36 minutos.
8. Guarde en refrigeración los amplificados para realizar la electroforesis en agarosa al 2%. El tamaño de banda esperado es de 330pb para *T. cruzi* o 300 – 450pb para *T. rangeli*.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL PARA VOLUMEN FINAL DE 15 uL	CANTIDAD PARA UNA MUESTRA, A VOLUMEN FINAL DE 15 uL
Buffer	5 X	1 X	3 uL
dNTPs	10 mM (10,000 uM)	0.2 mM (200 uM)	0.3 uL
Primers Forward	10 uM	0.2uM	0.3 uL
Primers Reverse	10 uM	0.2uM	0.3 uL
Taq Polimerasa	5 U/ul	0.025 U/ml	0.075 uL
Agua tipo PCR	/	/	9.025 uL
ADN	/	/	2 uL

Tabla Nª 1. Preparación de la mix.

Referencia: Parámetros corrida PCR: Pavia P. Caracterización molecular del elemento repetido disperso pequeño. SIRE, en las seis Unidades Discretas de Tipificación (DTU) de *Trypanosoma cruzi* y su aplicación en una prueba de PCR. 2011 <sup>(83)</sup>.

## ANEXO 8. Protocolo de amplificación de PCR para cebadores TCI – TCII – TCIII

TCI: 5'- GTG TCC GCC ACC TCC TTC GGG CC -3'

TCII: 5'- CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G -3'

TCC: 5'-CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG -3'

1. De acuerdo a la tabla N.1 calcular: 1) la cantidad de muestras a utilizar, incluyendo el control positivo y control negativo 2) las cantidades necesarias para preparar la mix, teniendo en cuenta el número de muestras.
2. Descongelar y hacer spin previo uso de los reactivos, exceptuando la Taq Polimerasa.
3. Preparar la mix, adicionando los reactivos en el siguiente orden: Buffer (incluye MgCl<sub>2</sub> 1,8 mM), dNTPs, primers y agua tipo PCR; usando puntas con filtro para evitar contaminación.
4. Adicionar finalmente la Taq Polimerasa, teniendo la precaución de tenerla el menor tiempo posible fuera de congelación. Hacer spin previo uso.
5. Dispensar en los tubos o en la placa, la mix usando puntas sin filtro, restando la cantidad de ADN que se va a adicionar (13 uL a cada uno).
9. Adicionar 2 uL de ADN (o cantidad necesaria de acuerdo a la concentración de ADN presente en cada muestra, nivelando las muestras de la misma cantidad para una sola mix) a cada tubo o placa y mezcle la mix individualmente.
6. Configurar y correr el termociclador de la siguiente manera: Desnaturalización 94°C – 1 minuto, amplificación de 27 ciclos (94°C – 30 segundos, 55°C – 30 segundos, 72°C – 30 segundos) y extensión final de 68°C – 5 minutos. Teniendo un tiempo total de corrido de 47 minutos.
7. Guarde en refrigeración los amplificados para realizar la electroforesis en agarosa al 2%. El tamaño de banda esperado es de 350pb (DTU I) y 300pb (otras DTU).

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL PARA VOLUMEN FINAL DE 15 uL	CANTIDAD PARA UNA MUESTRA, A VOLUMEN FINAL DE 15 uL
Buffer	5 X	1 X	3 uL
dNTPs	10 mM (10,000 uM)	0.2 mM (200 uM)	0.3 uL
Primers TCI	10 uM	0.2uM	0.3 uL
Primers TCII	10 uM	0.2uM	0.3 uL
Primers TCC	10 uM	0.2 uM	0.3 uL
Taq Polimerasa	5 U/ml	0.025 U/ml	0.075 uL
Agua tipo PCR	/	/	8.725 uL
ADN	/	/	2 uL

Tabla N<sup>o</sup> 1. Preparación de la mix.

Referencia: Parámetros de corrida PCR: Brisse S. y col. (2001) Characterisation of large and small subunit rRNA and mini – exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineajes <sup>(165)</sup>.

## **ANEXO 9. Protocolo para electroforesis en gel de agarosa**

1. En 30 ml de TBE 0.5 X (Tris base 50 mM, Ácido bórico 50 mM y EDTA 0.1 mM a pH 8.0), adicionar 0.3 g de agarosa (agarosa 1%).
2. Prepare al porcentaje deseado según el protocolo de la PCR a visualizar.
3. Caliente hasta ebullición y disolución completa de la agarosa.
4. Enfríe hasta aproximadamente 37°C.
5. Adicione 0.75 ul de SYBR-Safe DNA gel stain (1 ul por cada 40 ml) y agite suavemente.
6. Alistar la cámara de acuerdo al ensamblaje descrito en el protocolo de uso de la cámara de electroforesis.
7. Agregar la solución con agarosa en el soporte con el peine para pozos (utilice el peine deseado de acuerdo al número de pozos necesarios).
8. Deje solidificar de 15 a 20 minutos.
9. Retire el peine cuidadosamente y llene la cámara de electroforesis con TBE 0.5 X.
10. Sirva las muestras teniendo la precaución de no contaminar los pozos contiguos.
11. Adicione 0.5 ul de patrón de peso molecular.
12. Sirva en una placa de terasaki 0.5 ul de Blue Juice para cada muestra y mezcle de manera individual con 4 ul de cada muestra y sirva en el gel.
13. Corra las muestras ajustando los amperios de manera constante.
14. Ajuste el equipo a 100 v, 50mA y 250 Wats hasta que el frente de corrido llegue al final del gel (2cm antes del borde). Aproximadamente 40 minutos.
15. Observe en transiluminador y fotografíe los resultados obtenidos.

Protocolo establecido por el laboratorio de Medicina Veterinaria de la Universidad Antonio Nariño.

## **ANEXO 10. HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA (HAI)**

El procedimiento de HAI se divide en las siguientes fases:

### **A. Suspensión de glóbulos rojos lavados**

1. Medir 15 ml de sangre de cordero y centrifugar 10 minutos a 3000rpm.
2. Descartar el plasma.
3. Realizar lavado al sedimento de glóbulos rojos con suero fisiológico, completando el volumen a 15 ml y centrifugar 10 minutos a 3000rpm.
4. Repetir el tercer paso anterior 2 veces más.
5. Realizar una suspensión de glóbulos rojos al 2,8% de buffer fosfato pH 7,2, con un volumen final de 5 ml: 0,14 ml de sedimento de glóbulos rojos y 4,86 ml de PBS.

### **B. Tanización de glóbulos rojos**

1. Preparar una solución stock de ácido tánico (0,01g de ácido tánico + 1ml de solución salina)
2. Realizar una dilución 1/2000 de la solución stock de ácido tánico (solución de trabajo).
3. Mezclar 5 ml de la suspensión de glóbulos rojos con 5 ml de la solución de trabajo.
4. Incubar por 10 minutos a 37°C.
5. Centrifugar 7 minutos a 2000 rpm y descartar el sobrenadante.
6. Resuspender el sedimento en 10 ml de PBS pH 7,2.
7. Centrifugar 7 minutos a 2000 rpm y descartar el sobrenadante.
8. Resuspender el sedimento en 5 ml de solución salina.

### **C. Preparación del antígeno**

1. Centrifugar la solución que contiene los parásitos 10 minutos a 4000 rpm.
2. Retirar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 5 ml de PBS.
3. Centrifugar 10 minutos a 4000 rpm.
4. Retirar el sobrenadante, repetir el lavado.
5. Resuspender los parásitos en agua destilada (1:10).
6. Congelar a -70°C y descongelar a 37°C 6 veces.
7. Agregar un volumen igual de solución de NaCl al 1,7%.
8. Centrifugar 30 minutos a 4000 rpm.
9. El sobrenadante constituye el antígeno.
10. Agregar 1 ul citrato de sodio.
11. Conservar en congelación (-20°C) hasta su uso.

### **D. Sensibilización**

1. Preparar dos tubos: TUBO N° 1: 300ul de antígeno + 300ul de suspensión de glóbulos rojos tanados y TUBO N° 2 (control): 5 ml de glóbulos rojos tanados.
2. En un tubo nuevo, preparar una solución diluyente con suero negativo al 1% en PBS pH 7,2: 0,5 ml de suero + 45 ml PBS.
3. Incubar el TUBO N°1 y N°2, 20 minutos a 37°C.
4. Centrifugar 7 minutos a 2000 rpm y descartar el sobrenadante.
5. Lavar el sedimento con 10 ml de solución diluyente.
6. Centrifugar 7 minutos a 2000 rpm y descartar el sobrenadante.
7. Resuspender el sedimento en 5 ml de solución diluyente.

#### E. Prueba

1. Poner la placa en papel, toalla o franela humedecida, para prevenir el efecto de la electricidad estática.
2. Colocar en el primer pozo 75 ul de solución diluyente y 50 ul en los pozos necesarios para las diluciones deseadas.
3. En el primer pozo adicionar 25 ul de suero a evaluar y homogeneizar.
4. Realizar diluciones seriadas en base 2 con 50 ul de la dilución anterior y 50 ul de la solución diluyente adicionadas anteriormente, homogeneizar y repetir igual en la siguiente fila.
5. Agregar 500 ul de la suspensión antigénica en cada pocillo.
6. Agitar con suaves golpes en los bordes de la placa y dejarla en reposo sobre una superficie plana.
7. Realizar lectura a partir de 1 hora hasta las 24 horas.

#### F. Lectura

1. La falta de reactividad (negativo), se manifiesta por la sedimentación del antígeno en forma de botón, como indicador de la ausencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*.
2. La reactividad del suero (positivo), se manifiesta por la formación de una malla de bordes irregulares que cubre del 50 al 100% del fondo del pocillo, lo que indica la presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*.
3. Una muestra positiva se informa con el título de la última dilución positiva.

Referencia: Vega S, Naquira C. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas). Primera ed. Salud MdSylNd, editor. Lima: Ministerio de Salud y Instituto Nacional de Salud; 2005 <sup>(52)</sup>.

## ANEXO 11. Boletín de la mesa Cundinamarca sobre la enfermedad de Chagas



**¡SE BUSCA!**

**¿SABE USTED QUÉ ES LA ENFERMEDAD DE CHAGAS?**

mientras duerme



mientras juega



mientras come



¡puede ser usted el portador de esta enfermedad o estar en riesgo de adquirirla!

**LOS INVITAMOS A ENTERARSE SOBRE ESTA ENFERMEDAD**

**PARTICIPAR PUEDE SALVAR VIDAS**



ME OFICINA DE EDUCACIÓN

Boletín realizado como medio de información para los habitantes de La Mesa (Cundinamarca), y perteneciente al proyecto “Dinámica de la transmisión de *Trypanosoma cruzi*, en zonas urbanas, periurbanas y rurales en la región Andina – modelo municipio de La Mesa Cundinamarca”.

## ANEXO 12. Encuesta de humanos.



### Red de Chagas Colombia – INS / Instrumento de recolección de información para el proyecto “Dinámica de la transmisión de Trypanosoma cruzi en zonas urbanas, periurbanas y rurales en la región andina – modelo municipio La Mesa, Cundinamarca”

- ✓ La información de esta encuesta es confidencial y de uso exclusivo para conocer los factores de riesgo involucrados en la transmisión de la enfermedad de Chagas y recomendar estrategias para su control en el municipio de La Mesa.
- ✓ Diligencie el formato con letra clara y legible. No realice enmendaduras ni tachaduras.

ENCUESTA N°: _____ FECHA DD ____ MM ____ AA _____
ENCUESTADOR: _____
I. DATOS SOCIODEMOGRAFICOS:
APELLIDOS Y NOMBRES: _____
SEXO: _____ EDAD: _____ D.I. _____
DIRECCION: _____ BARRIO: _____
VEREDA: _____ TEL: _____
A QUE SE DEDICA: _____
EN DONDE TRABAJA: _____
HACE CUANTO VIVE AQUÍ: _____
DONDE VIVIA ANTES: _____ ZONA RURAL _____ ZONA URBANA _____
USTED HA ESTUDIADO HASTA QUE GRADO: PRIMARIA _____ BACHILLERATO _____
PROFESIONAL _____ TECNICO _____ TECNOLOGO _____ POSGRADO _____ COMPLETO _____
INCOMPLETO _____
AFILIACION A SALUD: SISBEN _____ CAPRECOM _____ CAFAM _____ CONVIDA _____
CAFESALUD _____ SOLSALUD _____ OTRO _____
EN EMBARAZO: SI _____ NO _____ SEMANAS: _____
HA RECIBIDO TRANSFUSIONES: SI _____ NO _____ EN QUE AÑO: _____
HA RECIBIDO TRANSPLANTES: SI _____ NO _____ EN QUE AÑO: _____
*si es menor de edad incluir:
NOMBRE PADRE Y/O MADRE: _____
EN DONDE ESTUDIA: _____

II. DATOS DEL GRUPO FAMILIAR	EDAD
NOMBRES Y APELLIDOS	

III. FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON CONOCIMIENTOS Y PRACTICAS	SI	NO
1. ¿conoce o ha escuchado hablar sobre la enfermedad de Chagas? <b>Si responde NO, pasar a la pregunta 8</b>		
2. ¿Ha padecido esta enfermedad?		
3. ¿Ha recibido tratamiento para esta enfermedad?		
4. ¿Sabe si hay tratamiento para esta enfermedad?		
5. ¿Algún ocupante de la casa ha tenido la enfermedad?		
6. ¿Sabe cómo se transmite la enfermedad de Chagas?		
7. ¿Conoce los síntomas de la enfermedad de Chagas?		
8. ¿Ha escuchado hablar de pitos? <b>Si responde NO, pasar a la pregunta 22</b>		
9. ¿Conoce los pitos?		
10. ¿Sabe dónde viven los pitos?		
11. ¿Sabe de qué se alimentan los pitos?		
12. ¿Ha tocado alguna vez a un pito?		
13. ¿Sabe cómo controlar a los pitos?		
14. ¿Ha visto pitos por dentro de su vivienda? <b>Si responde NO, pasar a la pregunta 16</b>		
15. ¿Los ha visto: De noche _____ De día _____ A qué hora?		
16. ¿Ha visto pitos fuera de su vivienda? <b>Si responde NO, pasar a la pregunta 18</b>		
17. ¿Los ha visto: De noche _____ De día _____ A qué hora?		
18. ¿Usted o algún otro habitante de su vivienda ha sido picado alguna vez por un pito?		
19. ¿Puede reconocer la materia fecal de un pito? <b>Si responde NO, pasar a la pregunta 22</b>		
20. ¿Ha visto materia fecal de pitos dentro o fuera de la vivienda?		
21. ¿Ha tocado materia fecal de pitos?		
22. ¿Ha escuchado hablar de pitos? <b>Si responde No, pasar a la pregunta 33</b>		



**Red de Chagas Colombia – INS / Instrumento de recolección de información para el proyecto “Dinámica de la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en zonas urbanas, periurbanas y rurales en la región andina – modelo municipio La Mesa, Cundinamarca”**

- ✓ La información de esta encuesta es confidencial y de uso exclusivo para conocer los factores de riesgo involucrados en la transmisión de la enfermedad de Chagas y recomendar estrategias para su control en el municipio de La Mesa.
- ✓ Diligencie el formato con letra clara y legible. No realice enmendaduras ni tachaduras.

**La siguiente información puede tomarse por observaciones del encuestador:**

23. ¿Conoce los chinches?		
24. ¿Sabe dónde viven los chinches?		
25. ¿Sabe de qué se alimentan los chinches?		
26. ¿Ha tocado alguna vez a un chinche?		
27. ¿Sabe controlar a los chinches?		
28. ¿Ha visto chinches bajo los colchones o tablas de la cama?		
29. ¿Usted o algún otro ocupante de la vivienda ha sido picado alguna vez por un chinche?		
30. ¿Puede reconocer la materia fecal de un chinche? <b>Si responde No, pasar a la pregunta 33</b>		
31. ¿Ha visto materia fecal de chinches en su cama?		
32. ¿Ha tocado materia fecal de chinche?		
33. ¿Voltea con frecuencia los colchones y tablas de las camas? De todas _____ De algunas _____ De ninguna _____		
34. ¿Usa toldillo para dormir? Todos _____ Algunos _____ Ninguno _____		
35. ¿Los toldillos están impregnados con insecticida? Todos _____ Algunos _____ Ninguno _____		
36. ¿Usan con frecuencia repelentes? Todos _____ Algunos _____ Ninguno _____		
37. ¿Acostumbra a usar insecticidas en la vivienda?		
38. ¿La vivienda ha sido fumigada en el último año?		
39. ¿Sabe si sus alimentos pueden estar contaminados con materia fecal de pitos?		
40. ¿Guarda los utensilios y enseres de cocina cubiertos o en lugares protegidos?		
41. ¿Guarda los alimentos crudos cubiertos o en lugares protegidos?		
42. ¿Guarda los alimentos cocinados cubiertos o en lugares protegidos?		
43. ¿Come o ha comido carne de animales de monte?		

**\*\*\* N° DE PERROS Y GATOS EN LA**

IV. FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON LA VIVIENDA Y SUS ANEXOS	SI	NO
44. El techo es de fibras vegetales (Paja o similares)		
45. Las paredes son de fibras vegetales y/o tierra sin acabados		
46. Las paredes tienen grietas o hendiduras		
47. El piso es de tierra		
48. El piso tiene grietas o hendiduras		
49. Hay luz eléctrica		
50. Hay angeos (mallas) en puertas y/o ventanas		
51. Hay materia fecal de pitos por dentro o fuera de la vivienda		
52. Hay animales domésticos (perros, gatos, loros, gallinas, etc.) ***		
53. Hay animales de monte cerca de las viviendas (ratas, borugos, chuchas, armadillos, etc.)		
54. Hay corrales, galones o construcciones similares anexas a la vivienda		
55. Hay enramadas o construcciones similares anexas a la vivienda		
56. Hay árboles (incluye palmas) cerca de la vivienda		
57. Hay objetos acumulados dentro y fuera de la vivienda		
58. Hay cuadros, calendarios, afiches u otros objetos en las paredes		

**VIVIENDA:** \_\_\_\_\_

**OBSERVACIONES:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

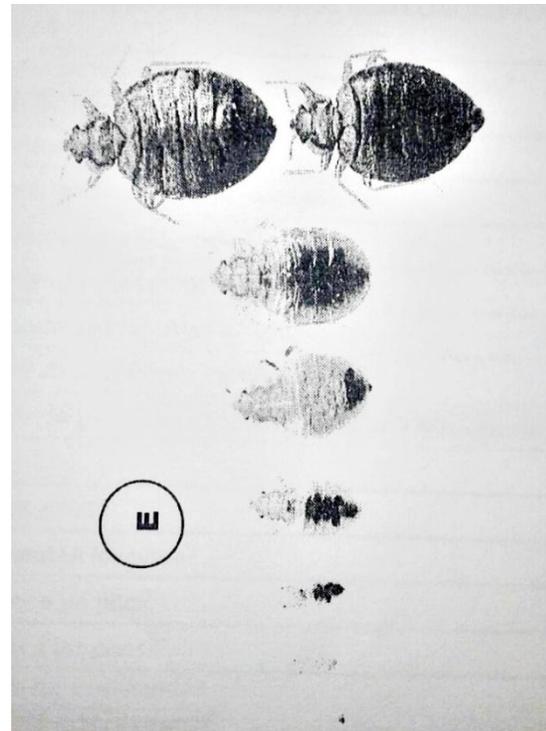
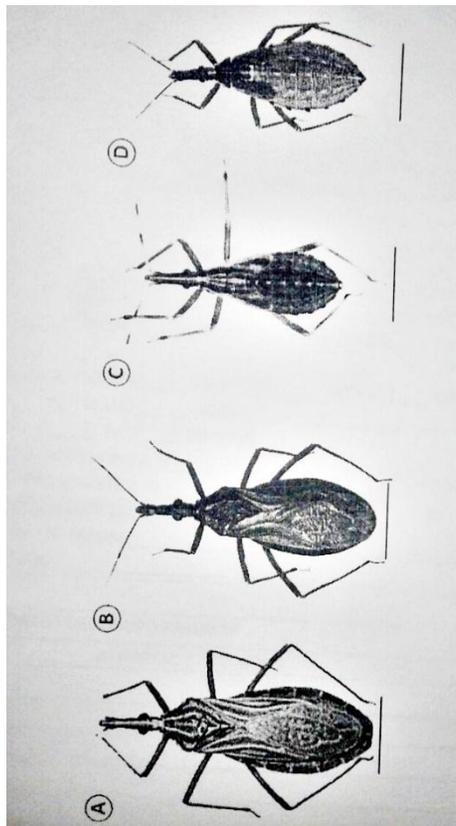
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

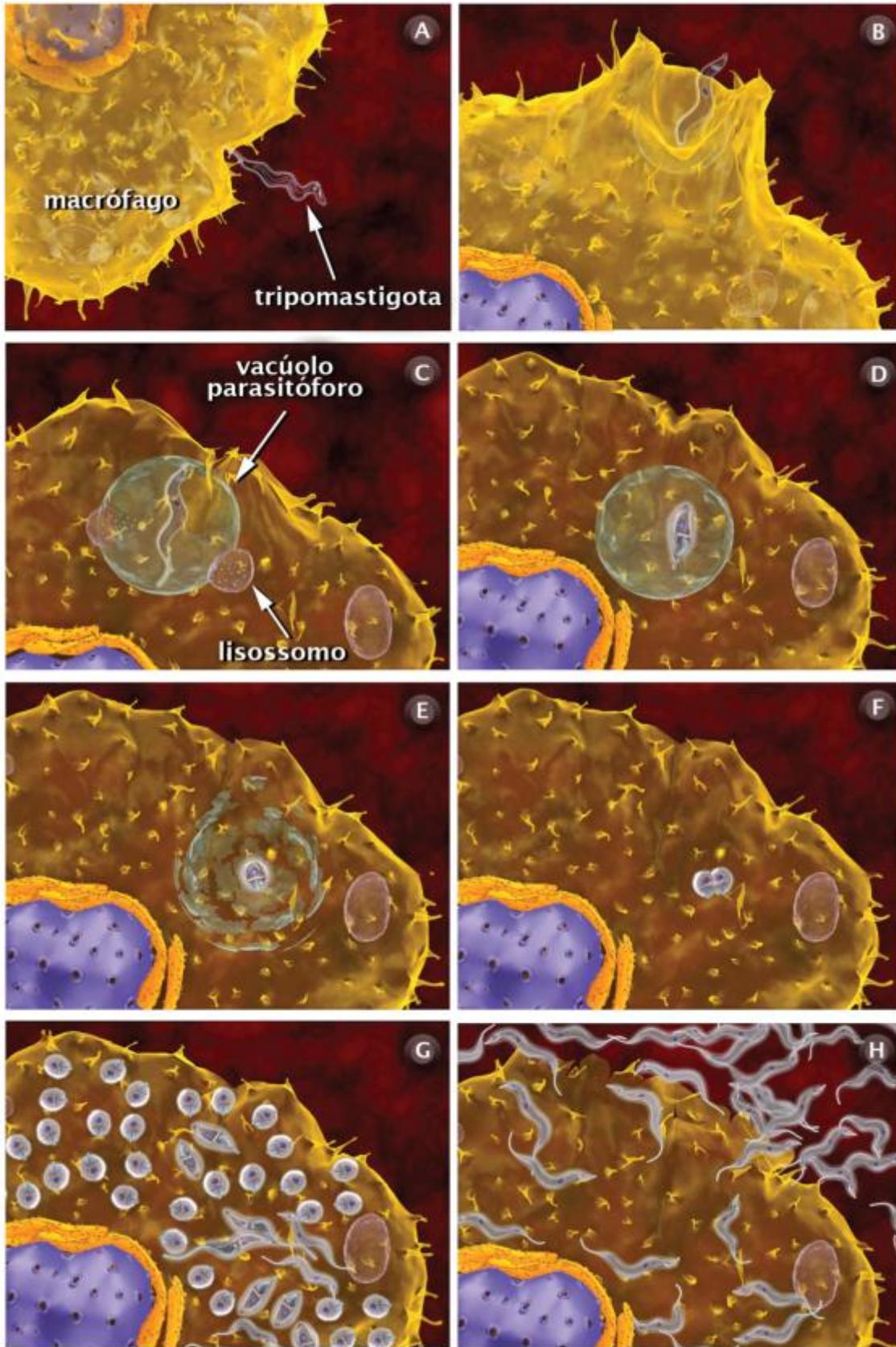
**Red de Chagas Colombia – INS / Instrumento de recolección de información para el proyecto “Dinámica de la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en zonas urbanas, periurbanas y rurales en la región andina – modelo municipio La Mesa, Cundinamarca”**

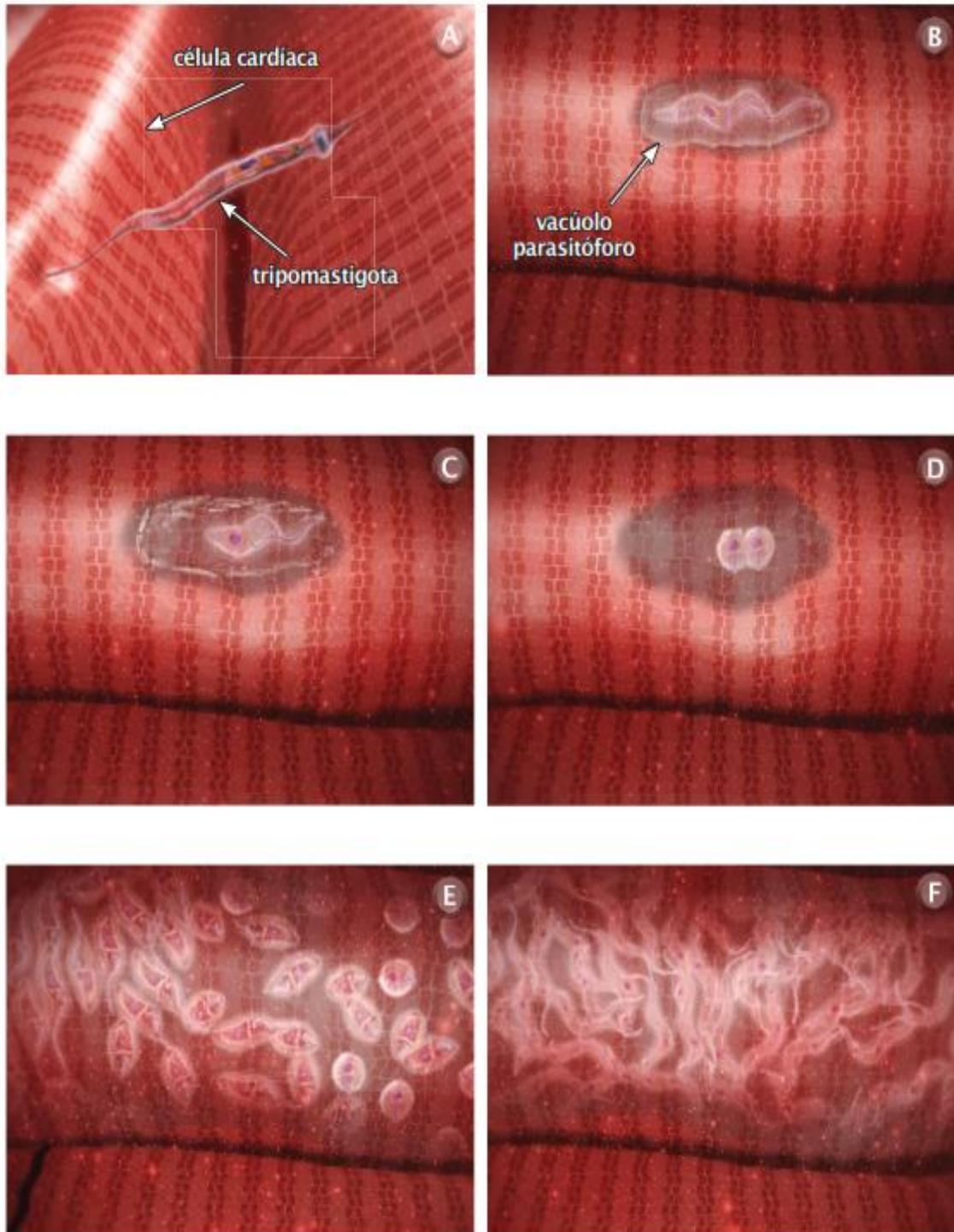
- ✓ La información de esta encuesta es confidencial y de uso exclusivo para conocer los factores de riesgo involucrados en la transmisión de la enfermedad de Chagas y recomendar estrategias para su control en el municipio de La Mesa.
- ✓ Diligencie el formato con letra clara y legible. No realice enmendaduras ni tachaduras.

**Pregunte al encuestado y señale sobre la imagen, cuál(es) vectores ha observado dentro o alrededor de la vivienda:**



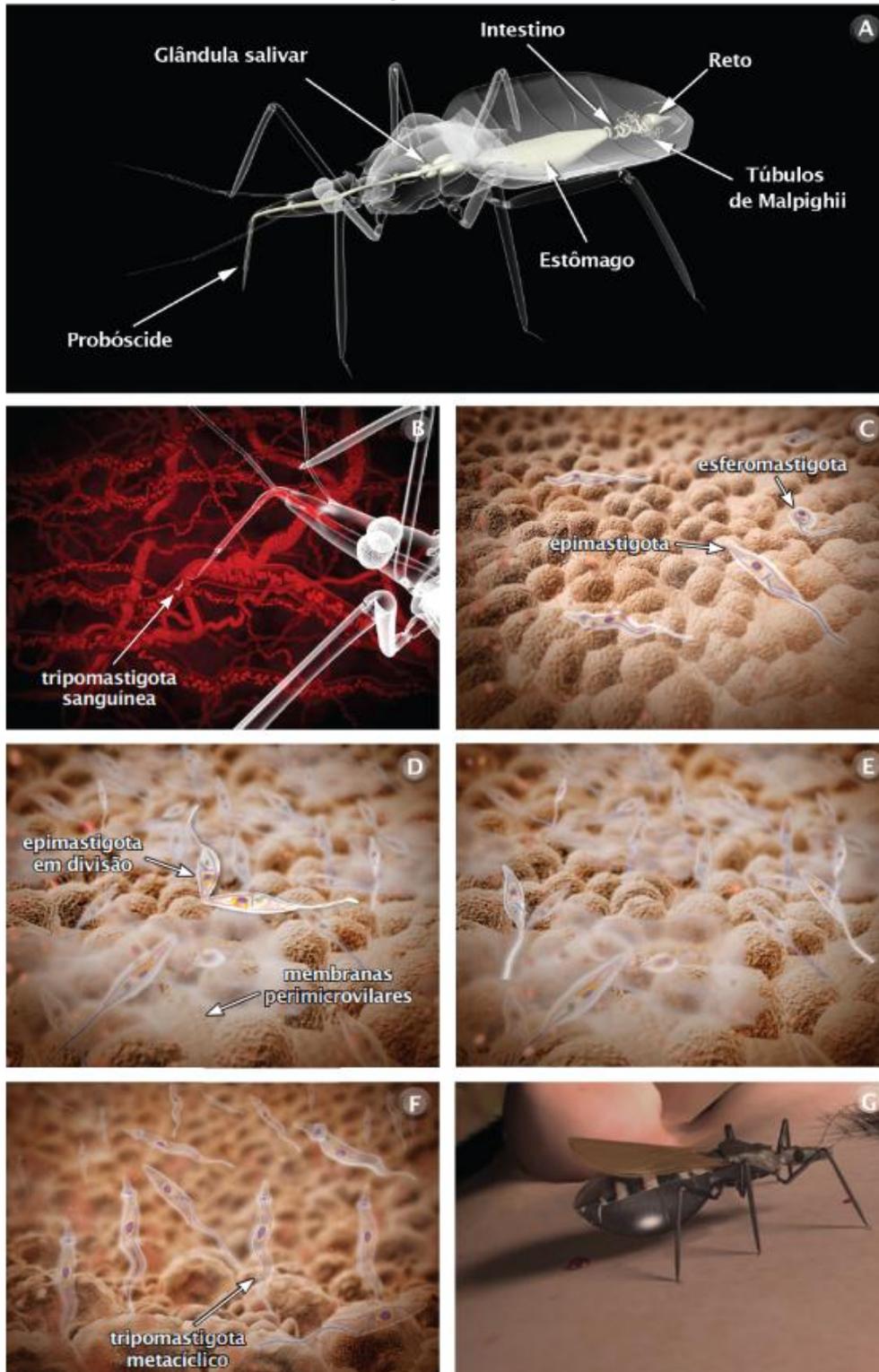
### ANEXO 13. Ciclo intracelular del parásito





Referencia: Teixeira D, Benchimol M, Crepaldi P, de Souza W. Atlas didáctico ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Primera ed. Teixeira D, Benchimol M, Crepaldi P, de Souza W, editors. Rio de Janeiro: Fundacao CECIERJ; 2011. <sup>(76)</sup>

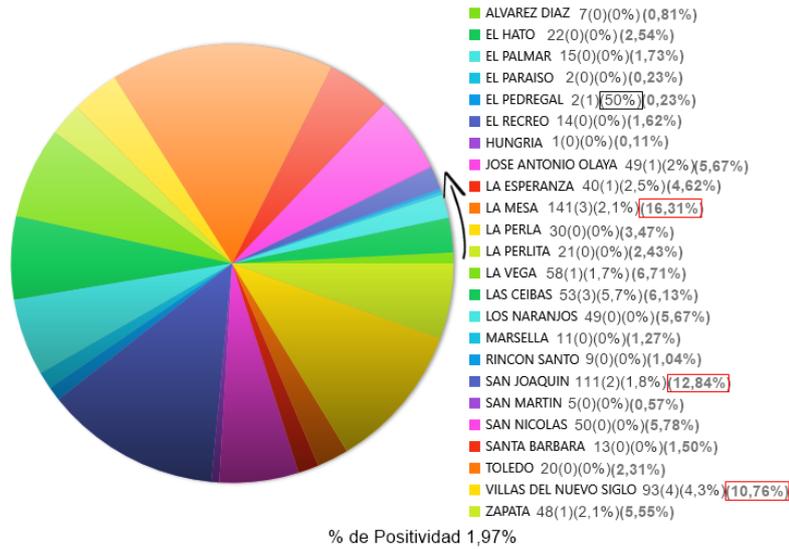
## ANEXO 14. Ciclo del parásito dentro del triatomino



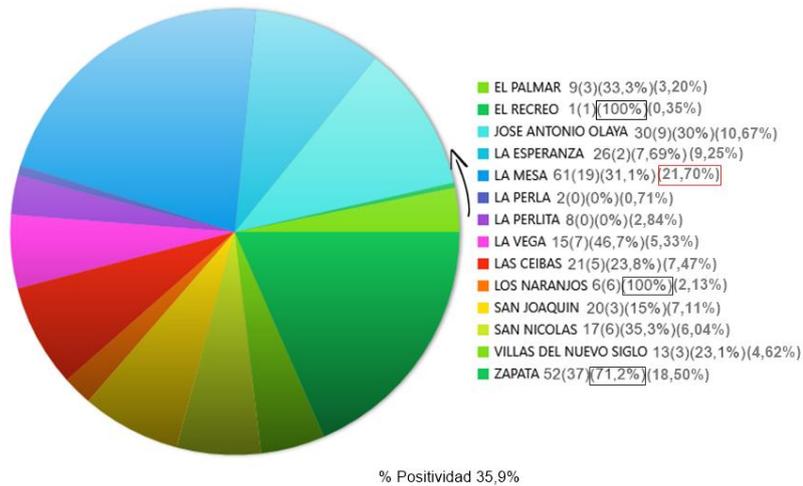
Referencia: Teixeira D, Benchimol M, Crepaldi P, de Souza W. Atlas didático ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Primeira ed. Teixeira D, Benchimol M, Crepaldi P, de Souza W, editores. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ; 2011. <sup>(76)</sup>

## ANEXO 15. Muestreo de humanos, caninos y triatominos

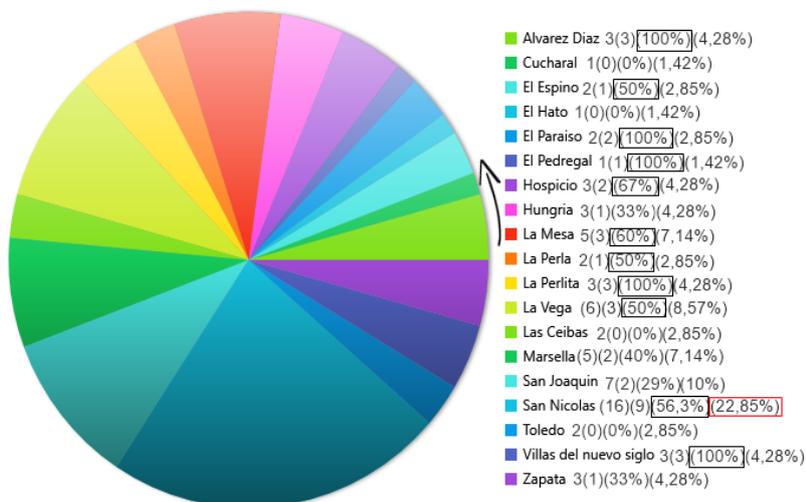
### Muestreo de Humanos en La Mesa Cundinamarca



### Muestreo en Caninos en La Mesa Cundinamarca



### Muestreo de Triatominos en La Mesa Cundinamarca



## ANEXO 16. Diseño de formulario Epi Info 7.0

# Datos de muestreo triatomino

Serial  ID base de datos

Año de captura  Numero de ejemplares  Estado

### Datos de captura

Municipio  Vereda o barrio

Finca  Zona

Lugar  Ambiente  Técnica

Colector

Datos adicionales

### Datos del triatomino

Especie  Estadio

Fecha de captura

### Datos obtenidos de la muestra

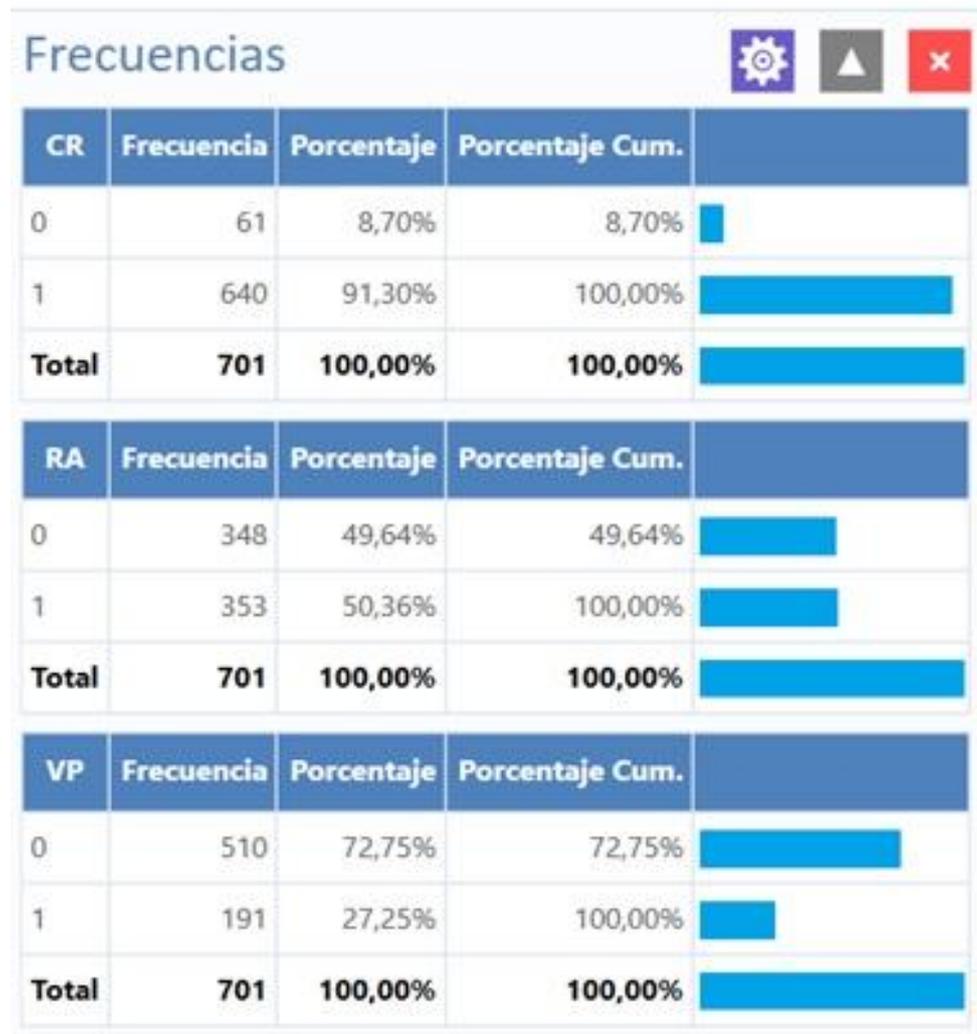
Examen en fresco  
 Negativo  Positivo

PCR  
 Negativa  Positiva  
 SD

Concentración de ADI

DTU

**ANEXO 17. Tabla de frecuencia de las encuestas analizadas frente a los factores de riesgo.**



## 12. REFERENCIAS

1. Saldaña C, Córdova O, Vargas F. UTILIZACIÓN DE *Lepidium peruvianum* MACA, COMO MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE *Trypanosoma cruzi*. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2006; 23(2).
2. Graiff D, Zurbriggen G, Aleu G, Sequeira G, Faya M, Marini V, et al. Seropositividad para *Trypanosoma cruzi* en caninos de la localidad de La Para (Córdoba, Argentina). InVet. 2009 Agosto; 11(1).
3. Ferrer E. Técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Universidad del Oriente de Venezuela. 2015 Marzo; 27(3).
4. Ibáñez G, Martínez A, Noguera B, López E, Alonso A, Perea C, et al. Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in Mexico. Parasitology international. 2013; 62(36-43).
5. Zeledón R. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' Disease. Elsevier. 1974; 52(1).
6. Minter D. Efectos de la presencia de animales domesticos. Bol of Sanit Panam. 1978; 84(4).
7. Espinoza F. Distribución y bionomía de los vectores de la enfermedad de Chagas en Colima. Tesis maestral en entomología médica. Monterrey: Universidad Autonoma de Nuevo León, Nuevo León; 1998.
8. Salvatella R. Los ciclos de transmisión de *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909) (Protozoa, Masigophora) en Uruguay. Rev med Uruguay. 1993 Septiembre; 9(1).
9. Colciencias. Dinámica de la transmisión de *Trypanosoma cruzi*, en zonas urbanas, periurbanas y rurales en la región Andina - modelo municipio de La Mesa Cundinamarca. 2015. Folleto.
10. Sanchez J. Información del comportamiento del programa Chagas Cundinamarca años 2002-2005. Universidad de los Andes. 2005 Mayo.
11. Krestchmer C. "Prevalencia de genotipos (clones) de *Trypanosoma cruzi* en micromamíferos. modulada por la presencia de distintos vectores, en sectores endémicos de tres regiones de Chile". Trabajo de grado. Santiago de Chile : Universidad de Chile , Santiago; 2010.
12. Ceballos L. Ciclo silvestre de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en el noroeste de argentina. Tesis doctoral. Buenos Aires : Universidad de Buenos Aires ; 2010.
13. Bravo T. *Trypanosoma cruzi* historia natural y diagnostico de la enfermedad de Chagas. Revista mexicana de patologia medica. 2004 Diciembre; 54(4).
14. Salud OMdl. La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana). Página web. ; 2017.
15. Suárez C, Rey Á, Orduz M, Prada R, Tarazona Z. Supervivencia de *Trypanosoma cruzi* en bebidas experimentalmente contaminadas. Biomédica. 2012; 32.
16. Angulo V. Aspectos ecologicos de la enfermedad de Chagas en el oriente de Colombia. MVZ cordoba. 2000; 5(1).

17. Gaviria Aea. Plan Decenal de Salud Pública. Bogotá: Ministerio de salud y protección social, Cundinamarca; 2013.
18. Hernández L, Ramírez A, Cucunubá Z, Zambrano P. Brote de Chagas agudo en Lebrija, Santander. Artículo institucional. 2009 Marzo; 4(1).
19. Vacca M, Mercado M. Determinación de las características operativas de las pruebas serológicas con cepas colombianas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Tesis para Maestría en Epidemiología Clínica. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C; 2005.
20. Palmezano J, Plazas L, Rviera K, Rueda V. Enfermedad de Chagas: realidad de una patología frecuente en Santander, Colombia. Revistas medicas UIS. 2014 Diciembre; 28(1).
21. Leonard J. Carlos Chagas pionero en salud en el interior de Brasil. *Bold of sanit panam.* 1991; 110(3).
22. Rueda K, Trujillo J, Carranza J, Vallejo G. Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *Biomédica.* 2014 Junio; 34(631-641).
23. Marcos D. Parasitosis Humanas. Tercera ed. Marcos D, editor. Medellín: Corporación para investigaciones biológicas (CIB); 1998.
24. Castillo D, Wolff M. Aspectos del comportamiento de los triatominos (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Biomédica.* 2000; 20.
25. Chagas C. Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1909.
26. Barr S. Canine Chagas' disease (American Trypanosomiasis) in North America. *Vet Clin Small Anim.* 2009; 39.
27. Nicholls R, al. e. Enfermedad de Chagas aguda en Colombia, una entidad poco sospechada. informe de 10 casos presentados en el periodo 2002-2005. *Biomedica.* 2007 Febrero; 27(1).
28. Internet. Bogotá: Organización Mundial de la Salud; 2014.
29. Rosas A, Ojeda G, Barrios A, Otteo M, Maruñak S. Tripanosomiasis americana en un canino del nordeste argentino, reporte de un caso clinico. *Rev. vet.* 2016 Febrero; 27(1).
30. Rosas F. Enfermedad de Chagas. *Revista colombiana de cardiologia.* 2011 Octubre; 18(5).
31. Bern C, Montgomery S. An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the United States. *Clinical Infection Diseases (CID).* 2009 September; 49.
32. Jackson Y, Gétaz L, Wolff H, Holst M, Mauris A, Tardin A, et al. Prevalence, Clinical Staging and Risk for Blood-Borne Transmission of Chagas Disease among Latin American Migrants in Geneva, Switzerland. *PLoS NEGLECTED TROPICAL DISEASES.* 2010 Febraury; 4(2).
33. da Silva S, al. e. Analisis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.* 2009 Diciembre; 103(1).

34. Molina I, Salvador F, Sánchez A. Actualización en Enfermedad de Chagas. Elsevier. 2016; 34(2).
35. Díaz M, González C. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. Revista de la universidad industrial de Santander. 2014 Agosto; 46(2).
36. Soto H, Tibaduiza T, Montilla M, Triana O, Suarez D, Torres M, et al. Investigación de vectores y reservorios en brote de Chagas agudo por posible transmisión oral en Aguachica, Cesar, Colombia. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2014 Abril; 30(4).
37. Reyes M, Torres A, Esteban L, Flóres M, Angulo V. Riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas por intrusión de triatominos y mamíferos silvestres en Bucaramanga, Santander y Bogotá. Biomedica. 2017 Marzo; 37.
38. Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Distribución geográfica de las especies de triatominos en los departamentos endémicos para la enfermedad de Chagas en Colombia. Universidad de los Andes. 2005 Mayo.
39. Social MdP. Enfermedad de Chagas memorias. Iladiba. 2013; 1.
40. Xavier S, Rodrigues A, Bilac D, Louzada V, da Costa S, Seixas E, et al. Distantiae Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A New Epidemiological Feature of Acute Chagas Disease in Brazil. PLoS NEGLECTED TROPICAL DISEASES. 2014 May; 8(5).
41. Dario M, Silva M, da Silva J, da Chagas S, D'Andrea P, Rodriguez A, et al. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). Parasites & Vectors. 2016; 9.
42. Kjos S, Snowden K, Creig T, Lewis B, Ronald N, Olson J. Distribution and characterization of canine Chagas. Veterinary parasitology. 2008 Diciembre; 152.
43. Deane. Double development cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Opossum. Parasitology today. 1986; 2(5).
44. Turriago C, Vallejo G, Guhl F. Seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* en perros de dos áreas endémicas de Colombia. Revista Med. 2008 Marzo; 16(1).
45. Reyes L, Silesky E, Cerdas C, Chinchilla M, Guerrero O. Presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en perros de Costa Rica. Parasitol Latinoam. 2002; 57.
46. Schweigmann N, et al. Estudio de la prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en zarigüeyas (*Didelphis albiventris*) en Santiago de Estero, Argentina. Rev Panam Salud Publica. 1999; 6(6).
47. Urdaneta-Morales S, Nironi L. *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of urban opossums I-Isolation and experimental infections. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996 Agosto; 91(4).
48. Carreira. Histopathological study of experimental and natural infections by *T. cruzi* in *Didelphis marsupialis*. Mem inst Oswaldo Cruz. 1996 Octubre; 91(5).
49. Conti O, Schweigmann J, Pietroko S, Bottazzi V, Wisnivesky-colli C. Search for *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of wild *Didelphis albiventris* from Santiago de Estero, Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995 Diciembre; 90(6).
50. Jansen A, Carreira J, Deane M. Infection of a mammal by monogenetic insect trypanosomatids (kinetoplastida, trypanosomatidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1988 September; 83(3).

51. Flores-Chávez M, de Fuentes I, Gárate T, Cañavate C. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 25(3).
52. Vega S, Naquira C. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas). Primera ed. Salud MdSyIND, editor. Lima: Ministerio de Salud y Instituto Nacional de Salud; 2005.
53. Vallejo G, Guhl F, Chiari E, Macedo A. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian host by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Tropica.* 1999 Octubre; 72.
54. Pinto M, Ocaña-Mayorga S, Lascano M, Grijalva M. Infection by Trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. *J. parasitol.* 2006 Mayo; 92(6).
55. Teixeira A, Hecht M, Guimaro M, Sousa A, Nitz N. Pathogenesis of Chagas's Disease: Parasite persistence and autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews.* 2011 Julio; 24(3).
56. Melo M, Moreira O, Tenório P, Lorena V, Lorena-Rezende I, Oliveira W, et al. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasites & Vectors.* 2015; 8.
57. Health TCfFS&P, Biologics IfiCiA. Enfermedad de Chagas. 2010. Folleto.
58. Miqueles C. Rendimiento del xenodiagnóstico y reacción en cadena de la polimerasa en la detección de *Trypanosoma cruzi* en deyecciones de triatominos. Tesis. Santiago de Chile: Universidad de Chile, Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias; 2005.
59. Villamil-Gómez W, Echeverría L, Ayala M, Mejia L, Eyes-Escalante M, Venegas-Hermosilla J, et al. Orally transmitted acute Chagas disease in domestic travelers in Colombia. *Journal of Infection and Public Health.* 2016 Mayo.
60. Cucunubá Z, Okuwoga O, Basáñez MG, Nouvellet P. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors.* 2016; 9(42).
61. Zetun C, Lucheis S, Troncarelli M, Langoni H. Infecção por *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres procedentes de zoológicos do estado de São Paulo. *Veterinaria e zootecnia.* 2014 Marzo; 21(1).
62. Mejia A, Triana O. Análisis por LSSP-PCR de la variabilidad genética de *Trypanosoma cruzi* en sangre y órganos de ratones. *Biomédica.* 2005 Enero; 25.
63. Guhl F, Vallejo G. Interruption of Chagas disease transmission in the Andean Countries: Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1999 Agosto; 94(1).
64. Hernández C, Salazar C, Brochero H, Teherán A, Buitrago L, Vera M, et al. Untangling the transmission dynamics of primary and secondary vectors of *Trypanosoma cruzi* in Colombia: parasite infection, feeding sources and discrete typing units. *Parasites & Vectors.* 2016.
65. Cucunubá Z, Cárdenas A, Pavia P, Montilla M, Aldana R, Villamizar K, et al. Prevalence and risk factors for Chagas disease in pregnant women in Casanare, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2012; 87(5).
66. Manrique-Abril D, Manrique-Abril F, Lorca M, Ospina J. Prevalencia de anticuerpos para *Trypanosoma cruzi* en caninos de dos municipios endémicos de Boyacá. *Rev. MVZ Córdoba.* 2011 Junio; 17(1).

67. Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiológica de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. *Biomédica*. 2007 Junio; 27(1).
68. Vásquez L, Galvao C, Pinto N, Granados H. Primer registro de *Triatoma nigromaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) para Colombia. *Biomédica*. 2005 Mayo; 25.
69. Moncayo A. Chagas disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2003 Julio; 98(5).
70. Angulo V, Esteban L. Nueva trampa para la captura de triatominos en hábitats silvestres y peridomésticos. *Biomédica*. 2011; 3(I).
71. Herrera L. *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas disease: boundaries between wild and domestic cycles in Venezuela. *Frontiers in Public Health*. 2014 Noviembre; 2.
72. Guhl F, Restrepo M, Angulo V, Antunes C, Campbell-Lendrum D, Davies C. Lessons from an national survey of Chagas disease transmission risk in Colombia. *TRENDS in parasitology*. 2005 Junio; 21(6).
73. Gomez A, Monteon V. Algunos aspectos de la organización y regulación genética en *Trypanosoma cruzi*: el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2008 Diciembre; 50(3).
74. Toso A, Vial F, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Med Chile*. 2011 Noviembre; 139.
75. Carlos N. "Evaluación de potenciales reservorios silvestres de *Trypanosoma* sp. en cuatro localidades de los departamentos de Amazonas y Loreto. Trabajo de grado para el título de maestría. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
76. Teixeira D, Benchimol M, Crepaldi P, de Souza W. Atlas didáctico ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Primera ed. Teixeira D, Benchimol M, Crepaldi P, de Souza W, editors. Rio de Janeiro: Fundacao CECIERJ; 2011.
77. Lima V, Mangia R, Carreira J, Marchevsky R, Jansen A. *Trypanosoma cruzi*: Correlations of biological aspects of the life cycle in mice and triatomines. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1999 Junio; 94(3).
78. Alessio G. Performance of TcI/TcVI/TcII Chagas-Flow ATE-IgG2a for universal and genotype-specific serodignosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS NEGLECTED TROPICAL DISEASE*. 2017 Marzo; 11(3).
79. Souto R, Fernandes O, Macedo A, Campbell D, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1996 September; 83.
80. Pinto A, de Lana M, Britto C, Bastrenta B, Tibayrene M. Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. *International Journal for Parasitology*. 2000 April; 30.
81. Ocaña-Mayorga S, Llewellyn M, Costales J, Miles M, Grijalva M. Sex, subdivision and Domestic Dispersal of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador. *PLoS NEGLECTED TROPICAL DISEASES*. 2010 November; 4(12).

82. Macedo A, Oliveira R, Pena S. Chagas disease: Roll of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert reviews in molecular medicine*. 2002 March.
83. Pavia P. Caracterización molecular del elemento repetido disperso pequeño, SIRE, en las seis Unidades Discretas de Tipificación (DTU) de *Trypanosoma cruzi* y su aplicación en una prueba de PCR. Tesis de Doctorado. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias; 2011.
84. Sierra V. IDENTIFICACIÓN DE UNIDADES DISCRETAS DE TIPIFICACIÓN (DTU'S) DE *Trypanosoma cruzi* EN MARSUPIALES (*Didelphus marsupialis*, *Didelphis virginianus*, *Philander opossum*) PRESENTES EN LA RESERVA ECOLÓGICA "EL ZAPOTAL" EN EL ESTADO DE CHIAPAS. Trabajo de grado de maestría. México: Universidad Autónoma del estado de México; 2016.
85. Briones M, Souto R, Stolf B, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Molecular and biochemical parasitology*. 1999; 104.
86. Zingales B, Miles M, Campbell D, Tibayrenc M, Macedo A, Teixeira M, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological, relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012 December; 12.
87. Arner. Database of *Trypanosoma cruzi* repeated genes: 20.000 additional gene variants. *BioMed Central*. 2007 October; 8.
88. Nantulya V. Trypanosomiasis in domestic animals: the problem of diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 1990; 9(2).
89. Sturm N, Campbell D. Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 2010 August; 115.
90. Aliaga C, Breniere S, Barnabé C. Further interest of miniexón multiplex PCR for a rapid typing of *Trypanosoma cruzi*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011 November; 11.
91. Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala F. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986 January; 83.
92. Tibayrenc M, Ayala F. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *TRENDS in Parasitology*. 2002 September; 18(9).
93. Westenberger S, Barnabé C, Campbell D, Sturm N. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics Society of America*. 2005 June; 171.
94. Subileau M, Barnabé C, Douzery E, Diosque P, Tibayrenc M. *Trypanosoma cruzi*: New insights on ecophylogeny and hybridization by multigene sequencing of three nuclear and one maxicircle genes. *Experimental Parasitology*. 2009 April; 122.
95. lenne S, Pedroso A, e Ferreira R, Briones M, Zingales B. Network genealogy of 195-pb satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010 April; 10.

96. Vallejo G, Carranza J, Ortiz P, Sanchez , Rodriguez B, Rivera F, et al. La interacción entre Tripanosomas y Triatomos: Aspectos evolutivos y epidemiológicos. Universidad de los Andes. 2005 Mayo.
97. Da Silveira A, de Lana M, Britto C, Bastrnta B, Tibayrenc M. Experimental Trypanosoma cruzi biclonal infection in Triatoma infestans; detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. International Journal for Parasitology. 2000 April; 30(843-848).
98. Burgos J, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, et al. Molecular identification of Trypanosoma cruzi Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation. Clinical Infectious Diseases. 2010 July; 51(5).
99. Martínez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda J, Florencio-Martínez L, Manning-Cela R, Figueroa-Angulo E. Gene expression in trypanosomatid parasites. Journal of biomedicine and biotechnology. 2009 November.
- 100 Pavia P, Montilla M, Flórez C, Herrera G, Ospina J, Manrique F, et al. Reporte del . primer caso de enfermedad de Chagas transplacentaria analizado por AP-PCR en Moniquirá, Boyacá. Biomédica. 2009 Junio; 29(513-522).
- 101 Mendoca C, Pamplona L, Moreira R, Barbosa S, Xavier S, Jansen A, et al. Domestic, . peridomestic and wild hosts in the transmission of Trypanosoma cruzi in the Caatinga área colonised by Triatoma brasiliensis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2014 November; 109(7).
- 102 Acosta N, Lopez E. Reservorios mamíferos del Trypanosoma cruzi en Paraguay. . Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2013 December; 9(2).
- 103 Gunter S, Brown E, Gorchakov R, Murray K, Garcia M. Sylvatic transmission of . Trypanosoma cruzi among domestic and wildlife reservoirs in Texas, USA: A review of the historical literature. Zoonoses and Public Health. 2016 March.
- 104 Curtis-Robles R, Lewis B, Hamer S. High Trypanosoma cruzi infection prevalence . associated with minimal cardiac pathology among wild carnivores in central Texas. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. 2016 April; 5.
- 105 Moreira F, Saab J, Lopes F, Miraglia H, de Miranda G, Jansen A. Complexity and . multi-factoriality of Trypanosoma cruzi sylvatic cycle in coatis, Nasua nasua (Procyonidae), and triatomine bugs in the Brazilian Pantanal. Parasites & Vectors. 2016; 9.
- 106 Noireau F, Diosque P, Jansen A. Trypanosoma cruzi: adaptation to its vectors and its . hosts. Vet. Res. 2009 February; 40(26).
- 107 Solis H, Carlos N. Reservorios silvestres de Trypanosoma cruzi en cuatro localidades . de las regiones Amazonas y Loreto. Theorema. 2015 Abril; 2(2).
- 108 Enciso C, Montilla M, Santacruz M, Nicholls R, Rodriguez A, Mercado M, et al. . Comparación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta un inmunoensayo enzimático y la prueba comercial Chagatek para la detección de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi. Biomédica. 2004 Enero; 24(104-108).
- 109 Jansen A, Santos A, Varella C, Cupolillo E, Mangia R, Fernandes O. The sylvatic cycle . of Trypanosoma cruzi: a still unsolved puzzle. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1999; 94(1).

- 110 Shikanai-yasuda M, Brisola C, Guedes L, Siqueira G, Barone A, Dias J, et al. Possible . oral transmission of acute Chaga's Disease in Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo*. 1991 October; 33(5).
- 111 Zingales B, Andrade S, Briones M, Campbell D, Chiari E, Fernandes O, et al. A new . consensus for *Trypanosoma cruzi* intraespecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2009 November; 104(7).
- 112 Devera R, Fernandes O, Rodrigues J. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" . complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2003 January; 98(1).
- 113 Manrique-Abril F, Ospina J, G H, Florez A, Pavia P, Montilla M, et al. Diagnóstico de la . enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas y recién nacidos de Moniquirá y Miraflores, Boyacá, Colombia. *Infectio*. 2013 Febrero; 17(1).
- 114 Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* . phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *International Journal for Parasitology*. 2000 Octubre; 30(35-44).
- 115 Ramirez J, Guhl F, Rendon L, Rosas F, Marin-Neto J, Morillo C. Chagas . cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients. *PLoS NEGLECTED TROPICAL DISEASES*. 2010 November; 4(11).
- 116 Sales-Campos H, Borges H, Pontes C, Pereira T, de Castilho A, Ramirez L, et al. . *Trypanosoma cruzi* DTU TcII presents higher blood parasitism than DTU TcI in an experimental model of mixed infection. *Acta Parasitológica*. 2015 March; 60(3).
- 117 Ramirez J, Duque M, Montilla M, Cucunubá Z, Guhl F. Natural and emergent . *Trypanosoma cruzi* I genotypes revealed by mitochondrial (Cytb) and nuclear (SSU rDNA) genetic markers. *Experimental parasitology*. 2012; 132.
- 118 Punekollu G, Gowda R, Khan I, Navarro V, Vasavada B. Clinical aspects of the . Chaga's disease. *International Journal of Cardiology*. 2007 Junio; 115.
- 119 Herrera C, Barges D, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo G, et al. Identifying four . *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infection, Genetic and Evolution*. 2007 December; 7.
- 120 Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo G, Guhl F. Haplotype identification . within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Tropica*. 2009 December; 110.
- 121 Ramírez J, Duque M, Guhl F. Phylogenetic reconstruction based on cytochrome b . (Cytb) gene sequences reveals distinct genotypes within Colombian *Trypanosoma cruzi* I populations. *Acta Tropica*. 2011 April; 119.
- 122 Ramirez J, Duque M, Montilla M, Cucunubá Z, Guhl F. Multilocus PCR-RFLP profiling . in *Trypanosoma cruzi* I highlights an intraspecific genetic variation pattern. *Infection, genetics and evolution*. 2012; 12.
- 123 Rueda M, Ramírez G, Osorio J. Aproximación a la biología de la zarigüeya común . (*Didelphis marsupialis*). *Boletín científico centro de museos-museo de historio natural*. 2013 Diciembre; 17(2).

- 124 Lozada S, Ramírez G, Osorio J. Características morfológicas de un grupo de . zarigüeyas (*Didelphys marsupialis*) del Suroccidente Colombiano. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2015 Noviembre; 26(2).
- 125 Ramírez G, Osorio J. Identificación de helmintos en zarigüeyas (*Didelphys marsupialis*) . en el Suroccidente Colombiano. *Revista Biosalud.* 2014 Agosto; 13(1).
- 126 Aponte J. Una revisión de la biología del *Didelphys marsupialis* y su relación con el mal . de Chagas y la Leishmaniasis. *Hipótesis: apuntes científicos uniandinos, número especial.* 2013.
- 127 Grisard E, Carvalho-Pinto C, Scholz A, Toma H, Schlemper B, Steindel M. . *Trypanosoma cruzi* infection in *Didelphys marsupialis* in Santa Catarina and Arvoredo Islands, Southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2000 December; 95(6).
- 128 Curtis-Robles R, Snowden K, Dominguez B, Dinges L, Rodges S, Mays G, et al. . Epidemiology and molecular typing of *Trypanosoma cruzi* in naturally-infected hound dogs and associated triatomine vectors in Texas, USA. *PLoS NEGLECTED TROPICAL DISEASES.* 2017 January.
- 129 Castillo R, Chou L, Quispe-Machaca V, Ancca-Juarez J, Malaga F, Bastos M, et al. . The potential of canine sentinels for reemerging *Trypanosoma cruzi* transmission. *Prev. Vet. Med.* 2015 July; 120(0).
- 130 Farfán-García A, Angulo-Silva V. Conducta alimentaria de poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) en una zona endémica y sus implicaciones epidemiológicas. *Rev. Salud Pública.* 2011 Febrero; 13(1).
- 131 Tenney T, Curtis-Robles R, Snowden K, Hamer S. Shelter dogs as sentinels for . *Trypanosoma cruzi* transmission across Texas, USA. *Emerging Infectious Diseases.* 2014 August; 20(8).
- 132 Cañavate C, Cuadros J, Martínez-Ruiz R, Martín-Rabadán P. *Procedimientos en . Microbiología Clínica* Cercenado E, Cantón R, editors. España: Seimc; 2009.
- 133 Cardoso M, Reis-Cunha J, Bartholomeu D. Evasion of the immune Response by . *Trypanosoma cruzi* during acute infection. *Frontiers in Immunology.* 2016 January; 6(659).
- 134 Flores P, Rivadeneira V. Tratamiento parasitocida de la enfermedad de Chagas. . *Prosac.* 2012; 8(1).
- 135 Cummings K, Tarleton R. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by . real-time PCR. *Molecular & Biochemical Parasitology.* 2003; 129(53-59).
- 136 Bacal F, Silva C, Pires P, Mangini S, Fiorelli A, Stolf N, et al. Transplantation for . Chagas' Disease: an overview of immunosuppression and reactivation in the last two decades. *Clin Transplant.* 2010; 24.
- 137 Rodríguez-Morales O, Ballinas-Verdugo M, Alejandro-Aguilar R, Reyes P, Arce- . Fonseca M. *Trypanosoma cruzi* congenital transmission in dogs with Chagas Disease: Experimental case report. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 2011; 11(10).
- 138 Urinovsky F, Salomone O, Córdoba R, Zazu A, Martínez A, Zlocowsky J, et al. . Morbimortalidad de los pacientes con miocardiopatía chagásica y trasplante cardíaco. Experiencia inicial. *Revista Argentina de Cardiología.* 2003 Septiembre; 71(5).

- 139 Vásquez C, Robledo S, Calle J, Triana O. Identificación de nuevos escenarios epidemiológicos para la enfermedad de Chagas en la región momposina, norte de Colombia. *Biomédica*. 2013; 33.
- 140 Villalobos G, Martínez-Hernández F, de la Torre P, Laclette J, Espinoza B. Entomological indices, feeding sources, and molecular identification of *Triatoma phyllosoma* (Hemipter:Reduviidae) One of the main vectors of Chagas disease in the Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 85(3).
- 141 Luquetti A. El diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Diagnóstico serológico, xenodiagnóstico, hemocultivo, PCR y examen directo. Universidad de los Andes. 2005 Mayo.
- 142 Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta tropica*. 2007 June; 103.
- 143 Dias E. Técnica do xenodiagnostico na molestia de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1940 Agosto; 35(2).
- 144 Duarte L, Flórez O, Rincón O, Gonzáles C. Comparación de siete pruebas diagnósticas para detectar infección por *Trypanosoma cruzi* en pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas. *Colombia médica*. 2014 Junio; 45(2).
- 145 Amanda R, Sá G, Dias K, Steindel K, Max G, Toledo J. Genotyping of *Trypanosoma cruzi* DTUs and *Trypanosoma rangeli* groups in experimentally infected *Rhodnius prolixus* by PCR-RFLP. *Acta Tropica*. 2016 Enero.
- 146 lab. W. Prueba de hemaglutinación indirecta para la detección de anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi*. 2000. Inserto de laboratorio.
- 147 Alviarez Y, Lares M, Vietri M, Aguilar C, Herrera L, Elizabeth F. Estandarización de la técnica de aglutinación directa para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Biomédica*. 2014 Marzo; 34(308- 317).
- 148 Cantillo-Barraza O, Gómez-Palacio A, Salazar D, Mejía-Jaramillo A, Calle J, Triana O. *Biomédica Revista del Instituto Nacional de Salud*. [Online].; 2010 [cited 2017 Septiembre 16]. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/272/461>.
- 149 Cundinamarca AdLM. Alcaldía de La Mesa - Cundinamarca. [Online].; 2016 [cited 2017 Agosto 20]. Available from: [www.lamesa-cundinamarca.gov.co/información\\_general.shtml](http://www.lamesa-cundinamarca.gov.co/información_general.shtml).
- 150 Suárez A, Ramírez H. Los carnívoros terrestres y semiacuáticos continentales de Colombia// Guía de campo. Primera ed. Bogotá, Colombia: GRACOM ; 2015.
- 151 Choi EH, Kwang S, Ihm C, Sohn YH. Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: Potential applications in biobanking. *Osong Public Health Res Perspect*. 2014 September; 5(6).
- 152 Briceño D, Caballero G, Lares M, Vietri M, Medina M, Ferrer E. Diagnóstico inmunológico de la enfermedad de Chagas, a partir de muestras colectadas en papel filtro. *Diagnóstico de la enfermedad de Chagas*. 2012 Abril; 16(1).
- 153 Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1994; 3(5).

- 154 Martínez I, Noguera B, Martínez-Hernández F, Espinoza B. Microsatellite and miniexon analysis of Mexican human DTU I *Trypanosoma cruzi* strains and their susceptibility to Nifurtimox and Benznidazol. *VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASE*. 2013; 13(3).
- 155 sostenible Mdayd. Decreto No. 1376. 2013. Por el cual se reglamenta el permiso de recolección de especies silvestres.
- 156 Ley 84 de 1989. Bogotá: Congreso de Colombia, Cundinamarca; 1989.
- 157 Resolución número 8430 de 1993. Bogotá: Ministerio de salud, Cundinamarca; 1993.
- 158 Padilla J. Situación actual de la enfermedad de Chagas en Colombia. Primer taller internacional sobre el control de la enfermedad de Chagas Universidad de los Andes. 2005 Mayo.
- 159 Qvarnstrom Y, Schijman A, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva A. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a Multi-Target Real Time PCR approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012 July; 6(7).
- 160 Moreira O, Ramírez J, Velázquez E, Lima-Ferreira C, Guhl F, Sosa-Estani S, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. *Acta Tropica*. 2013; 125(23-31).
- 161 Travi B, Jaramillo C, Montoya J, Segura I, Zea A, Goncalves A, et al. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 50(5).
- 162 Crisante G, Rojas A, Teixeira M, Añez N. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Tropica*. 2006 Junio; 98.
- 163 Green M, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cuarta ed. New York; 2012.
- 164 Association CB. *Census of Marine Zooplankton*. [Online].; 2009 [cited 2016 Septiembre 16]. Available from: [http://www.cmarz.org/barcode/protocols/barcode\\_cmarz\\_mtcoi\\_barcoding\\_protocol.html](http://www.cmarz.org/barcode/protocols/barcode_cmarz_mtcoi_barcoding_protocol.html).
- 165 Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. 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 April; 31.
- 166 Salud INd. *Boletín epidemiológico*. Página web. , Bogotá D.C; 2006-2017.
- 167 Instantáneas.. *Triatomidos infectados con trypanosoma cruzi en Cuernavaca (Morelos), México*. *Pan Am*. 1998; 3(3).
- 168 Dujardin J, Henriksson J, Victoir K, Brisse S, Gamboa D, Arévalo J, et al. Genomic Rearrangements in *Trypanosomatids*: an alternative to the "One Gene" Evolutionary hypotheses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2000 August; 95(4).
- 169 Becerril M, Angeles-Pérez V, Noguez-García J, Imbert-Palafox J. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en el municipio de Metztlán, Estado de Hidalgo,

México, mediante la caracterización de unidades domiciliarias y sus índices entomológicos. *Neotropical Entomology*. 2010 October; 39(5).

170 Guhl F. Memorias Primer Taller Internacional sobre el control de la Enfermedad de . Chagas. Primera ed. Guhl F, editor. Bogotá D.C: Ediciones Uni Andes; 2005.