

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Determinación de linajes y dinámica de la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en dos
provincias endémicas para la Enfermedad de Chagas en Ecuador

Tesis previa a la obtención del título de Doctor en Ciencias Biológicas

SOFIA B. OCAÑA MAYORGA

Quito, 2010

C I E I

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS**

Escuela de Biología

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Quito, 14 de Septiembre del 2010

Por medio de la presente, certifico que la tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas de la candidata Sofía B. Ocaña Mayorga ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Atentamente,



Dr. Mario Grijalva C.
Director de tesis

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue posible gracias al financiamiento y apoyo de las siguientes instituciones: Organización Mundial de la Salud, Programa especial para la investigación y entrenamiento en Enfermedades Tropicales (UNICEF/UNDP/World Bank/WHO/TDR) por la beca concedida para la realización de los estudios de doctorado (ID: A41393), al Instituto Nacional de Salud (DMID/NIAD/NIH), EE.UU, al Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Ohio, EE.UU, al proyecto ChagasEpiNet de la Unión Europea, al London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM), Reino Unido, PLAN Internacional del Ecuador, Children's Heartlink, EE.UU, la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología de Ecuador (SENACYT) (contrato #20090068) por la beca concedida para la realización de la pasantía en el LSHTM, al Ministerio de Salud Pública a través del Programa Nacional de Control y Vigilancia de la Enfermedad de Chagas en Ecuador.

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Mario Grijalva, director de tesis, por el apoyo incondicional, los consejos y por permitirme ver realidades más extensas, a la Dra. Laura Arcos-Terán, decana de la Facultad de Ciencias Exactas, por el apoyo institucional que ha sido primordial durante este proceso, al Dr. William Romoser, Dr. Ed Rowland, Dr. Calvin James, Dr. Jaime Costales y al Dr. Marco Neira por su tiempo, entusiasmo y disponibilidad para impartir las clases, al Dr. Michael Miles del LSHMT por permitirme cumplir uno de mis sueños y trabajar con su equipo, al Dr. Matt Yeo, Dr. Michael Lewis por su apoyo en los análisis de los resultados. Un cálido agradecimiento al Dr. Martin Llewellyn por su hospitalidad en Londres, por ser mi paciente tutor durante la pasantía en el LSHMT, pero sobretodo por ser un gran amigo con el que compartí largas horas de trabajo y tertulia.

A la gente que hacemos el CIEI: Anita Villacís, César Yumiseva, Rosita Chiriboga, Gaby Cueva, Miguel Pinto (CIEI de corazón) porque son un gran apoyo personal y profesional, a Esteban Baus por su apoyo en los complejos trámites administrativos, al Dr. Jaime Costales por el apoyo científico. A todos ustedes porque a pesar de todo, compartimos un mismo sueño. Un especial agradecimiento a Alejandra Zurita, quien ha dedicado muchas horas de su tiempo a este proyecto, a Josselyn García por su apoyo tanto en el campo como en el laboratorio, a todos los tesistas, voluntarios del CIEI y estudiantes de la Universidad de Ohio que colaboraron en la obtención de las muestras. A Miguel Pinto y Simón Lobos por su gran dedicación en la captura e identificación de los mamíferos. Un fraternal agradecimiento al personal de campo del SNEM: Freddy, Geovanny, Yeovany, Eddy, Víctor, Pancho, Santiago, Stalin, Néstor y muchos otros con quienes hemos trabajado por varios años, y por supuesto a las personas de las comunidades de Loja y Manabí. A todos ellos por su carisma, hospitalidad y empeño que nos permitieron realizar el trabajo de campo sin saber el profundo impacto que causaron en nosotros como personas.

Mi agradecimiento especial y profundo a mi familia, mis padres Beatriz y Roberto, mis hermanos Roberto y Ale, a mis ángeles Romina y Martín, a mis grandes amigos complicados: Galla, Alex, Saúl, Pao. A todos ustedes porque son la base de mi vida, por estar ahí cuando la cuesta es empinada y ser mi fuente de paz y risas. Los quiero mucho.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	IV
TABLA DE CONTENIDOS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABLAS.....	XIV
LISTA DE ANEXOS.....	XV
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas.....	5
3.1.1. Aspectos generales.....	5
3.1.2. Aspectos clínicos	6
3.1.3. Diagnóstico y tratamiento.....	7
3.2. Control y Prevención.....	10
3.2.1. Iniciativas de control.....	11
3.2.1.1. Iniciativa del Cono Sur (INCOSUR).....	11
3.2.1.2. Iniciativa del Pacto Andino (IPA).....	11
3.2.1.3. Iniciativa de Centro América (IPCA).....	12
3.2.1.4. Iniciativa de Vigilancia en la Amazonia (AMCHA).....	13
3.2.1.5. Control de la transmisión en países no endémicos.....	13
3.2.2. Perspectivas de las iniciativas de control y prevención.....	15
3.3. Situación de la Enfermedad de Chagas en Ecuador.....	15
3.4. Elementos de la transmisión de la Enfermedad de Chagas.....	18
3.4.1. Insectos vectores: triatominos.....	18
3.4.2. Mamíferos reservorios.....	20

3.4.3. Agente causal: <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
3.5. El parásito <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
3.5.1. Biología y ciclo de vida.....	23
3.5.2. Diversidad genética de <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
3.5.3. Dinámica de la transmisión de los linajes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
3.5.4. Genética de poblaciones de parásitos.....	28
3.5.4.1. Diversidad genética: Riqueza alélica y alelos exclusivos.....	29
3.5.4.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	29
3.5.4.3. Medida de ligamiento de los loci: desequilibrio de ligamiento e índices de asociación.....	30
3.5.4.4. Estructura poblacional y estadísticas de F.....	31
3.6. Marcadores moleculares usados en este estudio	33
3.6.1. Región hipervariable del minicírculo del kinetoplasto para la detección de infección por tripanosomátidos: <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Trypanosoma rangeli</i>	33
3.6.2. Determinación de linajes.....	33
3.6.2.1. Dominio divergente D7 del gen 24S α de Rarn.....	34
3.6.2.2. Gen de la proteína de choque térmico (<i>hsp60</i>).....	34
3.6.2.3. Gen de la glucosa-6-fosfato isomerasa (<i>gpi</i>).....	35
3.6.3. Análisis de microsatélites.....	36
3.7. Objetivo del estudio	37
3.7.1. Objetivo general.....	37
3.7.2. Objetivos específicos.....	37
4. MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1. Área de estudio	39
4.1.1. Manabí.....	39

4.1.2. Loja.....	39
4.2. Obtención de muestras.....	40
4.2.1. Búsqueda y colección de triatominos.....	40
4.2.2. Captura y procesamiento de mamíferos.....	41
4.3. Aislamiento de parásitos y análisis parasitológico.....	42
4.3.1. Obtención de aislados de triatominos	42
4.3.2. Obtención de aislados de mamíferos.....	44
4.4. Mantenimiento de cultivos.....	45
4.5. Extracción de ADN	46
4.6. Determinación de los índices de infección con tripanosomátidos.....	47
4.6.1. Amplificación de la región hipervariable del minicírculo del kinetoplasto.....	47
4.6.2. Criterios de identificación.....	47
4.7. Caracterización de linajes de <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	48
4.7.1. Amplificación del dominio D7 del gen 24S α de rARN, <i>hsp60</i> y <i>gpi</i>	48
4.7.2. Condiciones de amplificación.....	49
4.7.3. Digestión enzimática.....	49
4.7.4. Visualización de resultados.....	50
4.7.5. Criterios de identificación.....	50
4.8. Análisis de microsatélites.....	50
4.8.1. Amplificación de 10 loci polimórficos.....	50
4.8.2. Determinación de alelos.....	51
4.8.3. Efecto de la multiclonalidad.....	51
4.8.4. Agrupación de poblaciones: F_{ST} y STRUCTURE.....	52
4.8.5. Diversidad genética.....	54
4.8.6. Índice de heterocigocidad.....	54

4.8.7. Índice de endogamia.....	54
4.8.8. Índice de asociación.....	55
4.8.9. Aislamiento por distancia.....	55
5. RESULTADOS.....	56
5.1. Índices de infección con tripanosomátidos.....	56
5.1.1. Índice de infección en triatominos.....	56
5.1.2. Índice de infección en mamíferos.....	57
5.2. Caracterización de linajes de <i>T. cruzi</i>.....	59
5.3. Análisis de microsatélites.....	59
5.3.1. Agrupamiento de poblaciones ecuatorianas.....	60
5.3.2. Análisis de aislados de la provincia de Manabí.....	61
5.3.2.1. Agrupación de poblaciones de Manabí y el efecto de la multiclonalidad.....	62
5.3.3. Análisis de aislados de la provincia de Loja.....	63
5.3.3.1. Agrupación de poblaciones de Loja y el efecto de la multiclonalidad.....	63
5.3.3.2. Diversidad genética de las poblaciones de Loja.....	64
5.3.3.3. Índice de heterocigocidad de los aislados de Loja.....	65
5.3.3.4. Índice de endogamia en los aislados de Loja.....	66
5.3.3.5. Índice de asociación de las poblaciones de Loja.....	66
5.3.3.6. Efecto del aislamiento por distancia en los aislados de Loja.....	66
6. DISCUSIÓN.....	68
6.1. Infección de tripanosomátidos en triatominos.....	69
6.1.1. Infección con <i>Trypanosoma cruzi</i>	69
6.1.2. Infección con <i>Trypanosoma rangeli</i>	72
6.2. Infección de tripanosomátidos en mamíferos reservorios.....	75
6.3. Linaje de TcI de <i>T. cruzi</i> circulando en el Ecuador.....	77

6.4. Análisis de la genética de poblaciones de <i>T. cruzi</i> (linaje TcI) y su influencia en la transmisión del al ECh.....	79
6.4.1. Importancia del muestreo.....	79
6.4.2. Estructura poblacional de los aislados del linaje TcI.....	80
6.4.2.1. Influencia de los ciclos de transmisión.....	80
6.4.2.2. Efecto de la multiclonalidad.....	83
6.4.2.3. Loja: Evidencia de reproducción clonal en la población <i>LOJA_{Silv}</i> y reproducción sexual en la población <i>LOJA_{Dom/Peri.}</i>	85
6.4.2.4. Estructura poblacional en relación con la distancia geográfica.....	87
6.4.3. Rol de vectores y reservorios en los ciclos de transmisión: Eventos de invasión y dispersión de parásitos.....	88
6.4.3.1. Influencia de los vectores.....	89
6.4.3.2. Influencia de los reservorios.....	90
7. CONCLUSIÓN.....	92
8. LITERATURA CITADA.....	95
9. FIGURAS.....	108
10. TABLAS.....	128
11. ANEXOS.....	169

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de riesgo de transmisión de La Enfermedad de Chagas en Ecuador.....	109
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	110
Figura 3. Colección de triatomíneos en el campo	111
Figura 4. Colección de mamíferos en el campo	111
Figura 5. Esquema para la caracterización de linajes de <i>T. cruzi</i>	112
Figura 6. Perfiles de amplificación de dos loci de microsatélites	113
Figura 7. Distribución de <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> en hospederos de la provincia de Manabí.....	114
Figura 8. Distribución de <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> en hospederos de la provincia de Loja	115
Figura 9. Detección de la infección con <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> mediante la amplificación del kDNA (S35/S36) en aislados de triatomíneos y mamíferos de los hábitat de domicilio y peridomicilio en Loja y Manabí.....	116
Figura 10. Detección de la infección con <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> mediante la amplificación del kDNA (S35/S36) en aislados de triatomíneos y mamíferos del hábitat silvestre en Loja y Manabí	116
Figura 11. Amplificación del gen 24S α de rARN (D71/D72) de <i>T. cruzi</i> aislados de muestras de triatomíneos y mamíferos en los hábitat de peridomicilio y silvestre de Manabí	117
Figura 12. Amplificación del gen 24S α de rARN (D71/D72) de <i>T. cruzi</i> aislados de muestras de triatomíneos y mamíferos en los hábitat de domicilio, peridomicilio y silvestre de Loja	117
Figura 13. Amplificación del gen <i>hsp60</i> y los productos de restricción con la enzima <i>EcoRV</i> para la determinación del linaje de <i>T. cruzi</i> de aislados de triatomíneos colectados en el hábitat peridomiciliar y silvestre en Manabí.....	118

Figura 14. Amplificación del gen <i>hsp60</i> y los productos de restricción con la enzima <i>EcoRV</i> para la determinación del linaje de <i>T. cruzi</i> de aislados de mamíferos colectados en el hábitat peridomiciliar en Manabí	118
Figura 15. Amplificación del gen <i>hsp60</i> y los productos de restricción con la enzima <i>EcoRV</i> para la determinación del linaje de <i>T. cruzi</i> de aislados de triatomíneos colectados en el hábitat domiciliar y peridomiciliar en Loja.....	119
Figura 16. Amplificación del gen <i>hsp60</i> y los productos de restricción con la enzima <i>EcoRV</i> para la determinación del linaje de <i>T. cruzi</i> de aislados de triatomíneos colectados en el hábitat silvestre en Loja.....	119
Figura 17. Amplificación del gen <i>hsp60</i> y los productos de restricción con la enzima <i>EcoRV</i> para la determinación del linaje de <i>T. cruzi</i> de aislados de mamíferos colectados en el hábitat domiciliar, peridomiciliar y silvestre en Loja.....	120
Figura 18. Amplificación del gen <i>gpi</i> y los productos de restricción con la enzima <i>HhaI</i> para la determinación del linaje de <i>T. cruzi</i> de aislados de triatomíneos colectados en el hábitat peridomiciliar y silvestre en Manabí.....	120
Figura 19. Amplificación del gen <i>gpi</i> y los productos de restricción con la enzima <i>HhaI</i> para la determinación del linaje de <i>T. cruzi</i> de aislados de mamíferos colectados en el hábitat peridomiciliar en Manabí.....	121
Figura 20. Amplificación del gen <i>gpi</i> y los productos de restricción con la enzima <i>HhaI</i> para la determinación del linaje de <i>T. cruzi</i> de aislados de triatomíneos colectados en el hábitat domiciliar y peridomiciliar en Loja.....	121
Figura 21. Amplificación del gen <i>gpi</i> y los productos de restricción con la enzima <i>HhaI</i> para la determinación del linaje de <i>T. cruzi</i> de aislados de triatomíneos colectados en el hábitat silvestre en Loja.....	122

Figura 22. Amplificación del gen <i>gpi</i> y los productos de restricción con la enzima HhaI para la determinación del linaje de <i>T. cruzi</i> de aislados de mamíferos colectados en el hábitat domiciliar y peridomiciliar en Loja.....	122
Figura 23. Dendrograma de las poblaciones Ecuatorianas (Loja y Manabí).....	123
Figura 24. Dendrograma de las poblaciones de Manabí.....	124
Figura 25. Dendrograma de las poblaciones de Loja.....	125
Figura 26. Distribución de genotipos en relación al hábitat de captura en Loja.....	126
Figura 27. Estructura espacial y genética de las poblaciones de <i>T. cruzi</i> de la provincia de Loja.....	127

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura de los linajes de <i>T. cruzi</i> de acuerdo a la última reunión de estandarización.	129
Tabla 2. Información geográfica de las comunidades en donde se obtuvieron muestras de ADN de heces/contenido intestinal (insectos vectores) y sangre (mamíferos) para determinar los índices de infección con <i>T. cruzi</i> y/ó <i>T. rangeli</i>	130
Tabla 3. Primers de los 10 microsatélites polimórficos utilizados en este estudio.....	134
Tabla 4. Porcentaje de infección con <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> , por hábitat de colección y especie en triatomos colectados en comunidades rurales de las provincias de Manabí (2004-2008) y Loja (2005-2009)	135
Tabla 5. Porcentaje de infección con <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> , por hábitat de colección y especie en mamíferos colectados en comunidades rurales de las provincias de Manabí (2004-2007) y Loja (2002-2009)	137
Tabla 6. Resultado de la caracterización de muestras (tamaño de bandas) de Loja y Manabí con los marcadores <i>hsp60</i> , <i>gpi</i> y 24Sa	141
Tabla 7. Origen y resultado de la caracterización de los aislados incluidos en el análisis de microsatélites de la provincia de Manabí.....	150
Tabla 8. Origen y resultado de la caracterización de los aislados incluidos en el análisis de microsatélites de la provincia de Loja.....	153
Tabla 9. Tamaño, en pares de bases, de los alelos de los aislados de la provincia de Manabí.....	157
Tabla 10. Tamaño, en pares de bases, de los alelos de los aislados de la provincia de Loja.....	162
Tabla 11. Parámetros genéticos de las poblaciones dedomicilio/peridomicilio y silvestre de la provincia de Loja	168

LISTA DE ANEXOS

<p>Anexo 1. Pinto, C.M., Ocaña-Mayorga, S., Lascano, M.S., Grijalva, M.J. 2006. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. <i>Journal of Parasitology</i> 92(6): 1251–1255.....</p>	170
<p>Anexo 2. Black, C.L., Ocaña, S., Riner, D., Costales, J.A., Lascano, M.S., Davila, S., Arcos-Terán, L., Seed, R., Grijalva, M.J. 2007. <i>Journal of Parasitology</i> 93(1): 12–16.....</p>	171
<p>Anexo 3. Black, C.L., Ocaña-Mayorga, S., Riner, D.K., Costales, J.A., Lascano, M.S., Arcos-Terán, L., Preisser, J.S., Seed, J.R., Grijalva, M.J. 2009. Seroprevalence of <i>Trypanosoma cruzi</i> in rural Ecuador and clustering of seropositivity within households. <i>American Journal of Tropical Medicine and Hygiene</i> 81(6): 1035–1040.</p>	172
<p>Anexo 4. Ocaña-Mayorga S., Llewellyn, M.S., Miles, M.A., Grijalva, M.J. 2010. Sex, subdivisión and domestic dispersal of <i>Trypanosoma cruzi</i> lineage I in Southern Ecuador. (manuscrito).....</p>	173

1. RESUMEN

Trypanosoma cruzi, el agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, es un parásito altamente diverso y su transmisión se lleva a cabo dentro de tres ciclos (doméstico, peridoméstico y silvestre). En Ecuador, esta enfermedad constituye un problema de salud pública, sin embargo, la dinámica de la transmisión de la enfermedad es desconocida. Este estudio se llevó a cabo en dos provincias endémicas para la enfermedad: (10 comunidades en la provincia de Manabí y 92 en la provincia de Loja) con el objetivo de determinar la dinámica de las poblaciones de *T. cruzi* provenientes de los tres hábitats: domiciliario (dentro de las viviendas), peridomiciliario (cerca de las viviendas o en lugares asociados a actividades humanas) y silvestre (zonas alejadas de viviendas al menos 20 metros). Además, se incluyó en el análisis una amplia variedad de hospederos (vectores y reservorios). Se realizó la caracterización de los linajes circulantes y el análisis de 10 microsatélites polimórficos. Todos los aislados analizados, independientemente de su origen geográfico, hábitat y hospedero, fueron caracterizados dentro del linaje TcI. En Manabí, se encontraron altos índices de infección en las especies de vectores *Panstrongylus howardi* (peridomicilio) y *Rhodnius ecuadoriensis* (peridomicilio y silvestre); así como en marsupiales (*Didelphis marsupialis* y *Philander opossum*) en peridomicilio. La dinámica poblacional en esta región no pudo ser definida debido a la alta multiclonalidad de los aislados obtenidos, por lo que se recomienda el aislamiento de clones para futuros análisis. En Loja, el vector con mayor infección fue *R. ecuadoriensis*, y fue la única especie que se encontró colonizando todos los hábitats (domicilio, peridomicilio y silvestre), mientras que los roedores (*Mus musculus*) y marsupiales (*D. marsupialis*) en el domicilio y peridomicilio, respectivamente, fueron los principales reservorios. En esta provincia se identificaron dos poblaciones discretas, las cuales

presentan ciclos de transmisión diferentes: *LOJA*_{Dom/Peri} (aislados de hábitat domiciliar y peridomiciliar) y *LOJA*_{Silv} (aislados del hábitat silvestre). Se encontró una fuerte correlación entre la distancia geográfica y genética de los aislados *LOJA*_{Silv}, mientras que, los datos de los aislados *LOJA*_{Dom/Peri} sugieren que existe un flujo genético constante entre estas poblaciones y que implicaría a una influencia antropogénica en la dispersión del parásito. Además se observó un flujo genético, aunque no frecuente, entre las poblaciones selváticas y domésticas/peridomésticas en la que los mamíferos sinantrópicos podrían actuar como factores vinculantes entre ambos ambientes. Finalmente, los análisis genéticos demostraron en *LOJA*_{Dom/Peri} la primera evidencia de sexualidad en una población natural de *T. cruzi*. Dos aspectos importantes se derivan de los resultados obtenidos en este trabajo. El primero se relaciona con la aplicación práctica de la información molecular en el diseño de estrategias de control, tomando en cuenta que la dinámica poblacional de los parásitos está influenciada por las características intrínsecas locales y que debe ser analizada en una escala geográfica restringida. En segundo lugar, se rompe con el paradigma de la clonalidad de *T. cruzi*, como ha sucedido en otros parásitos de importancia médica, lo que puede tener consecuencias significativas en la epidemiología de este importante patógeno.

Palabras clave: ciclos de transmisión, Ecuador, Enfermedad de Chagas, genética de poblaciones, microsatélites polimórficos, *Trypanosoma cruzi*.

2. ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas disease, is a highly variable parasite. Its transmission takes place within three cycles (domestic, peridomestic and sylvatic). In Ecuador, this disease is a public health problem; however, its transmission dynamics are unknown. This study was carried out in two endemic provinces for the disease (10 communities in Manabí and 92 in Loja) with the aim of determining the population dynamics of *T. cruzi* from different environments: domicile (within dwellings), peridomicile (near dwellings and/or places associated with human activities) and sylvatic (areas more than 20 meters from dwellings). Furthermore, it included a wide diversity of hosts (vectors and reservoirs). The samples were characterized in lineages and also 10 polymorphic microsatellite loci were analysed. All isolates, independently from host and geographic origin, were determined to belong to TcI. In Manabí province, the highest infection index was found in the *Panstrongylus howardi* (peridomicile) and *Rhodnius ecuadoriensis* (peridomicile and sylvatic) vectors, as well as in marsupials (*Didelphis marsupiales* y *Philander opossum*) in the peridomicile. The dynamics of the parasite population, in this region, could not be elucidated due to the high multiclonality encountered in the parasite isolates. Cloning of parasites is recommended to circumvent this limitation in future analyses. On the other hand, in Loja province, the vector species showing the highest infection rate was *R. ecuadoriensis*. Additionally, this was the only vector species found in the sylvatic environment, while the main reservoirs were rodents (*Mus musculus*) and marsupials (*D. marsupialis*) in the domicile and peridomicile, respectively. Within this province, two discrete populations were defined $LOJA_{Dom/Peri}$ (isolates from domicile and peridomicile) and $LOJA_{Silv}$ (isolates from sylvatic environment). A strong spatial correlation between genetic and geographic distance was

found within *LOJA*_{Silv} while, constant genetic flow was determined among isolates from *LOJA*_{Dom/Peri} implicating anthropogenic influence (probably caused by synanthropic mammals) in parasite dispersion. Furthermore, genetic flow between sylvatic and domestic/peridomestic populations, although not frequent, exists, and implicates anthropogenic factors and synanthropic mammals as linkage between both environments. Finally, genetic analyses provide population genetic evidence for sex in a natural population of this parasite (*LOJA*_{Dom/Peri}). Two important issues are derived from the results obtained. The first is related with the the practical application of genetic information in the design of control strategies considering that the population dynamics are influenced by the intrinsic characteristics of the area and that might be analyzed at a local scale. In second place, these results challenge the paradigm of clonality in *T. cruzi*, as in the case of other parasites of medical importance, which implies significant consequences in the epidemiology of this important pathogen.

Key words: transmission cycles, Ecuador, Enfermedad de Chagas, population genetics, polymorphic microsatellites, *Trypanosoma cruzi*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

3.1.1. ASPECTOS GENERALES

Esta enfermedad es causada por el parásito flagelado *Trypanosoma cruzi* y es transmitida a través de varias vías, siendo la principal la transmisión vectorial por el contacto de heces contaminadas, de insectos Triatominos de la familia Reduviidae, con mucosas ó el torrente sanguíneo. Originalmente, la enfermedad de Chagas (ECh) fue una enfermedad enzoótica que se mantuvo en ambientes silvestres. Sin embargo, cuando el hombre empezó la invasión de ecotopos naturales, ya sea por agricultura o ganadería, la infección empezó a transmitirse a humanos (de forma accidental, siendo los humanos una nueva fuente de alimento para los triatominos) y se convirtió en una antropozoonosis (Coura, 2007). Otras vías alternativas de transmisión incluyen: transfusiones sanguíneas y de órganos, transmisión congénita, y por ingestión de comida contaminada.

La zona de transmisión de esta enfermedad se extiende desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina en un rango geográfico de 42° de latitud norte a 40° de latitud sur (Moncayo y Silveira, 2009). Si bien el área en la que ocurre la transmisión vectorial se limita a los rangos de distribución de los triatominos, su distribución se extiende fuera de Latinoamérica por efecto de la migración hacia otros países, principalmente del hemisferio norte (Estados Unidos y Europa), que ha sido un proceso continuo influenciado por la situación política y económica de Latinoamérica. En estos

países, considerados no endémicos para la ECh, la transfusión de sangre o sus productos derivados, son la fuente de transmisión más importante (Schmunis, 2007).

Las estadísticas calculadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimaron, para el 2006, alrededor de 15 millones de personas infectadas, mientras que, 28 millones de personas viven en riesgo de contraer la enfermedad (WHO/TDR, 2007).

3.1.2. ASPECTOS CLÍNICOS

El ciclo intracelular de *T. cruzi* inicia cuando los parásitos ingresan al torrente del mamífero y penetran en las células (fagocíticas y no fagocíticas), especialmente, aunque no exclusivamente, en tejido muscular. Dentro de la célula los parásitos escapan de la vacuola fagocítica y se diferencian en amastigotes que a su vez se replican para luego transformarse en tripomastigotes y volver al torrente, iniciando de esta forma otro ciclo de infección al invadir otras células. Durante la infección inicial, esta multiplicación puede causar una lesión cutánea o ocular que se hace evidente en el sitio de entrada del parásito para luego esparcirse por el organismo (Miles, 2009).

Este proceso paulatino de invasión celular y posterior daño en los tejidos ha definido las distintas etapas clínicas de la enfermedad. La OMS considera dos fases sucesivas: La fase aguda que se presenta inmediatamente después de la infección inicial y la etapa crónica que inicia cuando la parasitemia baja a un nivel indetectable (WHO, 2002).

La fase aguda dura entre seis y ocho semanas, los síntomas no son específicos (fiebre, inflamación en los nódulos linfáticos, reacción inflamatoria en el sitio de la

picadura) y en pocos casos puede presentarse una miocarditis severa o meningoencefalitis. En esta etapa los parásitos se encuentran circulando en la sangre invadiendo varios tipos de células nucleadas. La mortalidad durante esta etapa no es común pero suele suceder en niños o en adultos con problemas de inmunodeficiencia (Tarleton *et al.*, 2007).

A la fase aguda le sigue la forma indeterminada de la fase crónica. Esta se caracteriza por no presentar síntomas y los parásitos no son detectables por microscopía directa, no obstante, se puede detectar la presencia de IgG anti-*T. cruzi* en la sangre. Alrededor del 50 a 70% de los pacientes infectados permanecen en esta condición intermedia toda la vida. Sin embargo, este paciente, puede mantener ciertos niveles de parásitos circulando en el torrente sanguíneo, por lo que puede ser considerado un reservorio y por tanto una fuente de transmisión de *T. cruzi* (WHO, 2002).

Entre 20 a 35% de los pacientes crónicos desarrollan lesiones irreversibles en corazón, esófago, colon o sistema nervioso periférico (Moncayo y Silveira, 2009). Este proceso puede llevar décadas hasta manifestarse. Se desconocen las razones por las que ciertos pacientes no presentan los síntomas crónicos y otros sí. No obstante, se cree que características genéticas de los parásitos, así como la respuesta inmune del paciente podrían ser factores que determinen la presentación de las diferentes manifestaciones clínicas (Tarleton *et al.*, 2007).

3.1.3. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

A pesar de que en el 2010 se cumplen 101 años de la descripción de la ECh, la OMS estimó 41 200 nuevos casos por año en 21 países, sin contar con un número indeterminado de personas que adquieren la infección sin conocerlo. Grandes esfuerzos se

han hecho para evitar la transmisión de la enfermedad y el control de las poblaciones de triatomíneos ha sido particularmente exitoso. Sin embargo, el implementar y mantener los programas de vigilancia epidemiológica, si bien es una de las estrategias más importantes, es apenas una de las aristas que considerar. Otros objetivos importantes son el proveer atención médica y social efectiva a pacientes en los que se ha diagnosticado la enfermedad, la detección temprana de nuevos casos (Sosa-Estani *et al.*, 2009) y el control de la transmisión transfusional mediante el tamizaje obligatorio en donantes voluntarios.

El hacer un diagnóstico adecuado y oportuno de la ECh, especialmente en la fase aguda, es primordial para la aplicación de un tratamiento efectivo. Sin embargo, se debe considerar que debido a las condiciones socio-económicas en las que se presenta la ECh, estos métodos de diagnóstico deben ser simples, baratos, altamente sensibles y específicos (López-Antuñano *et al.*, 2000). Actualmente, los métodos de diagnóstico se basan en la detección de parásitos circulantes, en la fase aguda, y de anticuerpos en la fase crónica. La Organización Mundial de la Salud recomienda el uso de al menos dos pruebas serológicas diferentes para establecer el diagnóstico (WHO, 2002). No obstante, y a pesar de que las manifestaciones clínicas han sido descritas, sólo un pequeño número de pacientes reciben diagnóstico clínico y se desconoce, con certeza, la proporción de pacientes que presentan síntomas moderados o son asintomáticos. Una de las estrategias que se ha utilizado para detectar casos crónicos de la enfermedad es el uso de pruebas rápidas cuyas ventajas son ser de sencilla aplicación (no requiere una estructura de laboratorio) y permitir el tamizaje en población abierta. Este tipo de pruebas han mostrado varios niveles de desempeño por lo que no se recomienda como método de diagnóstico, sin embargo su uso es muy recomendado para la detección de casos congénitos y estudios de campo (Luquetti *et al.*, 2003; Ponce *et al.*, 2005; Sosa-Estani *et al.*, 2008; Brutus *et al.*, 2008).

Si el diagnóstico de la ECh es aún un tema en discusión, el tratamiento también requiere atención. El objetivo del tratamiento es el de eliminar los parásitos del individuo infectado, lo que tiene dos consecuencias directas: 1) disminuir la probabilidad de desarrollar un cuadro crónico de la enfermedad, y 2) romper la cadena de transmisión (Sosa-Estani *et al.*, 2009). Uno de los aspectos controversiales gira en torno a la evaluación de la cura, dentro de los cuales se considera la cura parasitológica y clínica. Parasitológicamente, es casi imposible evaluar la eliminación del parásito de la sangre y los tejidos, mientras que clínicamente la evaluación de cura es un proceso a largo plazo y de difícil determinación debido a la variación en la patogénesis (Coura y de Castro, 2002).

Desde finales de los años 60 se utiliza nifurtimox (Lampit, Bayer), actualmente discontinuado, y benznidazol (Rochagan/Radanil, Roche) como tratamiento para eliminar el parásito. Inicialmente el tratamiento se aplicaba a todos los pacientes diagnosticados con la ECh, sin embargo, a partir de los años 80 el tratamiento dejó de aplicarse a pacientes crónicos por la escasa evidencia de la resolución de la infección (Sosa-Estani, 2009). En el año 2004, se inició un ensayo clínico denominado BENEFIT que tiene como objetivo el evaluar la eficacia del benznidazol aplicado a pacientes chagásicos crónicos que presentan la forma cardíaca de la enfermedad. Este proyecto busca determinar si la aplicación sistemática de este medicamento logra disminuir la carga parasitaria y como consecuencia los signos cardíacos derivados de la infección crónica (Marin-Neto *et al.*, 2009). Este proyecto aún se encuentra en proceso y sus resultados serán muy importantes para determinar y estandarizar el uso de un tratamiento tripanocida en pacientes crónicos con signos clínicos y en fase indeterminada. Por otro lado, la aplicación del tratamiento ha tenido buenos resultados en el caso de pacientes agudos, infecciones crónicas recientes (niños menores de 12 años) e infecciones congénitas (Coura y de Castro, 2002) en alrededor del 70% de los pacientes tratados con cualquiera de los dos medicamentos

disponibles (Marin-Neto *et al*, 2009). Sin embargo, las dificultades están relacionadas con la duración del tratamiento y el seguimiento de los pacientes (60 días para el tratamiento con benznidazol, único medicamento disponible actualmente) (Pinto Dias, 2003). Además, ambos medicamentos causan graves efectos secundarios lo que influye en la tendencia de interrumpir el tratamiento. El desarrollo de nuevos y mejores medicamentos es un tema pendiente. Debido al contexto socio-económico de la ECh, la industria farmacéutica ha demostrado poco interés en la inversión en investigación, por lo que pocos compuestos nuevos han sido probados. Entre ellos están el alopurinol y ketoconazole, sin embargo sus resultados han sido variados y aún siguen siendo evaluados (Coura y de Castro, 2002).

3.2. CONTROL Y PREVENCIÓN

La ECh fue descrita en 1909 por Carlos Chagas, a partir de esa fecha se empezó a estudiar su distribución a lo largo de toda Latinoamérica. Para el año 2002, el control de la ECh estaba incluido dentro de la agenda política de todos los países endémicos y la mayoría de ellos contaban con programas activos de vigilancia vectorial y control, con excepción de México, Costa Rica, Guyana, Guyana Francesa y Ecuador (Dias *et al*, 2002). Sin embargo, la falta de una vacuna y tratamiento adecuado ha impedido que se emplee una misma estrategia para controlar esta enfermedad a lo largo de todo su rango geográfico, y el reto está en adaptar los diferentes mecanismos a las situaciones epidemiológicas y políticas específicas de cada región en base a estrategias que puedan ser aplicadas en forma extensiva. En este sentido, los programas de control se centran en la interrupción de la transmisión, específicamente la transmisión vectorial y transfusional. No obstante, el control de la transmisión congénita ha pasado a ser otro componente importante dentro del manejo integral de la ECh.

3.2.1. INICIATIVAS DE CONTROL

3.2.1.1. INICIATIVA DEL CONO SUR (INCOSUR)

Esta fue la primera iniciativa de control para la ECh aplicada a nivel continental e involucra a Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Perú y Uruguay. Inició en 1991 con apoyo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y con el objetivo de eliminar al principal vector en esa área, *Triatoma infestans*, de los ecotopos de domicilio y peridomicilio e interrumpir la transmisión transfusional mediante el mejoramiento de la red de bancos de sangre y un tamizaje eficiente. La aplicación de este programa de control fue exitosa a nivel regional e incluyó aspectos técnicos y decisiones políticas de la mano con grandes inversiones económicas por parte de cada país. Esto llevó a la eliminación o drástica reducción de las poblaciones de *T. infestans* en diferentes áreas y la declaración de áreas libres de transmisión vectorial a Uruguay (1997) y Chile (1999), 13 estados de Brasil, 6 provincias de Argentina y un departamento en Paraguay (Dias, 2007). Durante este proceso se fortalecieron los programas de control a nivel nacional y los procesos de control de calidad y evaluaciones sistemáticas a los bancos de sangre en los países involucrados. Actualmente, la continuación de actividades enfocadas a la detección y seguimiento de casos congénitos, junto con la implementación de campañas educativas están siendo parte de las acciones (Dias, 2007).

3.2.1.2. INICIATIVA DEL PACTO ANDINO (IPA)

Esta iniciativa inició en 1997, está formado por Venezuela, Colombia, Ecuador y el norte de Perú y tiene como uno de sus principales objetivos el de controlar las poblaciones de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*. A diferencia de la INCOSUR, el progreso no

ha sido el esperado debido al desconocimiento de las características biológicas de las poblaciones de estas especies de vectores. De hecho, en el transcurso se incluyó a *Rhodnius ecuadoriensis* como parte de los vectores de importancia epidemiológica y considerados viables para la eliminación local (OPS, 2004). Esta iniciativa fue diseñada primordialmente para eliminar y vigilar procesos de reinfestación de viviendas con poblaciones de triatominos, y luego avanzar progresivamente a la detección y tratamiento de casos (OPS, 2004). En Ecuador, los avances más importantes obtenidos, a nivel político, incluyen el establecimiento de un Programa Nacional de Control y Vigilancia de la Enfermedad de Chagas, el cual fue creado por decreto el 31 de Octubre del 2003, bajo Acuerdo Ministerial N°. 0632 (MSP, Ecuador) y recibió financiamiento en el año 2005. En 1999, la Organización Panamericana de la Salud establece el tamizaje obligatorio para cinco marcadores serológicos, incluyendo la ECh, en donantes y receptores de sangre y sus componentes (OPS/OMS, 1999); mientras que el 22 de diciembre del 2006 se promulga una legislación, según la Ley Orgánica de Salud Art. 73-75 y al Art. 5 del capítulo VI, en el que se establece el Programa de Evaluación Externa del Desempeño como mecanismo de control en los Servicios de Sangre del país, en el cual la ECh está incluida.

3.2.1.3. INICIATIVA DE CENTRO AMÉRICA (IPCA)

Esta iniciativa inició a la par de la IPA e incluye a los siguientes países Centroamericanos: Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Panamá. En esta región, la población de triatominos no es, al parecer, estrictamente domiciliar por lo que las estrategias de control deben adaptarse a las características entomológicas locales. El control se centra en tres especies que son: *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius pallescens* y *Triatoma dimidiata*. Entre los principales avances obtenidos por esta iniciativa está la interrupción de la transmisión por *R. prolixus* en

Guatemala, Honduras, El Salvador y Nicaragua, y la cobertura del 100% de donantes en bancos de sangre en Belice, El Salvador y Honduras (Moncayo y Silveira, 2009).

3.2.1.4. INICIATIVA DE VIGILANCIA EN LA AMAZONIA (AMCHA)

Es la iniciativa de control más reciente, inició en el año 2004 y centra sus esfuerzos en la extensa área de bosque húmedo tropical de la Amazonia. La falta de información epidemiológica es el principal problema para conocer la magnitud de ECh en esta zona, considerando que la densidad poblacional es 1,24 habitantes/km² (Aguilar *et al*, 2007). Los países involucrados en esta iniciativa son: Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, Venezuela, Guyana Francesa, Guyana y Surinam. En esta región, las condiciones epidemiológicas difieren de los patrones encontrados en otras zonas endémicas. Los mecanismos de transmisión incluye la infección por vía oral (ingesta de alimentos o reservorios contaminados), vectorial domiciliar (sin colonización) siendo *T. maculata*, *P. geniculatus*, *R. neglectus* y *R. stali* las especies implicadas y, transmisión vectorial extrdomiciliar en la que el contagio se produce por contacto accidental de humanos con triatomíneos silvestres, en este último caso, el vector implicado es *R. brethesi* (Anónimo, 2007). Esta iniciativa se encuentra en una etapa de levantamiento de información y estandarización de modelos de vigilancia basada en análisis serológico y en la detección de tripanosomátidos en muestras para el diagnóstico de malaria (Moncayo y Silveira, 2009).

3.2.1.5. CONTROL DE LA TRANSMISIÓN EN PAÍSES NO ENDÉMICOS

La distribución natural de *T. cruzi* se relaciona con la distribución de sus hospederos (vectores y mamíferos), sin embargo, la infección humana con este parásito se

ha reportado en 21 países de Norte, Centro y el Sur de América. Debido a la naturaleza de la infección, el parásito puede mantenerse, aunque en niveles bajos, por décadas en el torrente sanguíneo de una persona infectada, lo que hace posible la transmisión mediante transfusión de sangre y trasplante de órganos. Esta es la principal forma de transmisión en países no endémicos. Según datos del Centro Latinoamericano y Caribeño de Demografía/Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CELADE/CEPAL), las condiciones políticas y económicas influyeron en el aumento de migración de latinoamericanos desde la década de los 70 y los países que reciben una mayor cantidad de migrantes latinos son Estados Unidos, España y Canadá (CELADE, 2008). Si a esto sumamos el hecho de que la ECh forma parte de las NTD (Neglected Tropical Diseases), o enfermedades tropicales olvidadas, tenemos como resultado una falta de conocimiento sobre esta enfermedad en los países no endémicos. Es a partir de finales de la década de los 80 e inicios de los 90 que se empezaron a detectar casos en donantes de sangre en Estados Unidos y España (Schmunis, 2007) y recientemente se han extendido los estudios de enfermedades tropicales importadas en grupos de riesgo como inmigrantes y viajeros (Norman *et al.*, 2010). En el caso de la ECh, en países no endémicos y especialmente en países con un alto número de inmigrantes latinoamericanos, el control de la transmisión se basa en la detección de casos de donantes de sangre, órganos, y mujeres embarazadas (transmisión vertical). Las estrategias van desde el tamizaje serológico para *T. cruzi* en donantes de países endémicos para la ECh, la utilización de cuestionarios, hasta el evitar el uso de sangre de donantes provenientes de zonas endémicas (Schmunis, 2007). Sin embargo, aún queda pendiente que cada país tenga una legislación clara para evitar la discriminación de inmigrantes que presenten la infección.

3.2.2. PERSPECTIVAS DE LAS INICIATIVAS DE CONTROL Y PREVENCIÓN

En la mayoría de los países en donde se han implementado los programas de control, se han realizado avances significativos en términos de control de poblaciones domiciliadas de triatominos y tamizaje de donantes de sangre, sin embargo, el reto radica en asegurar la sostenibilidad a largo plazo de los programas de vigilancia entomológica y aplicación de estrategias de control. No obstante, Schofield *et al.*, 2006 señalan que estos avances sufren de “el castigo del éxito”, en el que la inversión y el apoyo político a los programas de control se ha visto reducido en forma proporcional a la reducción de la incidencia de la enfermedad. El efecto se traduce en la pérdida de continuidad en la aplicación de las estrategias de control, que si bien mantienen la prioridad en las poblaciones domiciliarias de triatominos, no están poniendo el énfasis necesario en poblaciones peridomésticas y selváticas que representan un riesgo para la transmisión de la ECh independiente del establecimiento de colonias domiciliadas (Schofield *et al.*, 2006). La continuidad de la vigilancia entomológica y parasitológica es una actividad clave para el éxito y mantenimiento a largo plazo de las estrategias de control aplicadas. Sin embargo, para que sea sostenible se requiere de un eficiente sistema de reporte en el que la comunidad esté involucrada y más importante aún, una respuesta a estos reportes para que el interés no se desvanezca.

3.3. SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN ECUADOR

La última revisión publicada sobre la epidemiología de la ECh en Ecuador fue realizada por Aguilar *et al.* en 1999. En ese momento el conocimiento sobre el estado epidemiológico se restringía a cálculos estimados y reportes de los años 30, 40 y 50. La

situación entomológica se basó en la poca información sobre reportes de triatominos, y una revisión sobre la biogeografía de los considerados principales vectores (Abad-Franch *et al.*, 2001). Un amplio documento sobre el control de la ECh, preparado por Abad-Franch y Aguilar en el 2003, para el Ministerio de Salud Pública del Ecuador, presenta estimaciones sobre prevalencia, incidencia y el valor en carga social y económica que representa la ECh al país, y en base a estas estimaciones caracterizó las cinco zonas de riesgo. En orden de riesgo descendente y tomando en cuenta la actual división política del país, dichas regiones son: zona I (Guayas, Santa Elena, Manabí, Loja y El Oro), zona II (Azuay, Los Ríos y algunos cantones de Santo Domingo de los Tsachilas –antes parte de Pichincha -, Cañar y Bolívar), zona III (Región Amazónica), zona IV (Esmeraldas y algunos cantones de Bolívar, Cotopaxi, Cañar y Chimborazo) y la zona V (algunas parroquias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Cotopaxi y Chimborazo) (Figura 1). Si bien esta información es invaluable, es de suma importancia el conocimiento actualizado sobre el estado epidemiológico, debido a que ésta es la información que se requiere para poder implementar las diferentes estrategias de control.

A continuación se realizará una rápida revisión sobre la información entomológica que consta en los documentos antes mencionados, en contraste con los resultados obtenidos durante varios años de investigación realizados por el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas.

A nivel entomológico, se consideraba a *Triatoma dimidiata* como el vector más importante en la transmisión de la ECh en Ecuador y cuatro especies más (*Rhodnius ecuadoriensis*, *R. pictipes*, *R. robustus* y *Panstrongylus geniculatus*) estaban implicadas en la transmisión de *T. cruzi* a humanos. Por otro lado, se determinó que otras especies como *T. carrioni*, *P. rufotuberculatus*, *P. howardi* y *P. chinai* podrían tener un rol en la

transmisión en ciertas áreas (Aguilar *et al.*, 1999). Los resultados de estudios realizados durante los últimos 9 años demuestran un estado entomológico diferente. Extensas búsquedas entomológicas en la provincia de Manabí, donde se reportaba la presencia abundante de *T. dimidiata*, han detectado poblaciones restringidas de esta especie, sin embargo, se ha encontrado una gran densidad y amplia distribución de *P. howardi* y *R. ecuadoriensis* asociados a asentamientos humanos (Suarez-Davalos *et al.*, 2010). En la provincia de Loja, cinco especies están implicadas en la transmisión a humanos: *R. ecuadoriensis*, *T. carrioni*, *P. rufotuberculatus* y *P. chinai*, siendo los dos primeros los más abundantes y con mayor distribución; y los dos últimos restringidos a hábitats domiciliarios (Grijalva *et al.*, 2005a; Grijalva y Villacís, 2009), a pesar de ser considerados vectores silvestres (Abad-Franch y Aguilar, 2003). En el caso de la provincia de Guayas, incluida en la zona de riesgo I, se reporta a *T. dimidiata* como principal vector, sin embargo, no se encontraron evidencias de presencia de triatomíneos en 5 comunidades investigadas en el norte de la provincia, probablemente debido a los cambios antropogénicos que ha sufrido el área en relación al cultivo de arroz y el uso indiscriminado de pesticidas (Grijalva *et al.*, 2010), y la presencia de *T. dimidiata* se limita a reportes del Servicio de Erradicación de la Malaria (SNEM) del MSP, en el cerro Santa Ana en la ciudad de Guayaquil y en el cantón Playas.

Los datos oficiales de prevalencia e incidencia continúan siendo estimativos y proyecciones en base a la poca información existente. En el 2006, la Organización Panamericana de la Salud estimó una prevalencia, en Ecuador, de 1,7%, y una población de aproximadamente seis millones de personas, en zonas endémicas, en riesgo de contraer la infección. El Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP) incluye a la ECh dentro de las enfermedades de notificación obligatoria sujetas a vigilancia epidemiológica y el dato de incidencia para el 2007 fue de 0,27%. Si bien la prevalencia e incidencia real son

difíciles de estimar, se han realizado estudios focalizados de seroprevalencia en provincias como Loja, Manabí, Guayas, El Oro y parte de la Amazonia (Grijalva *et al.*, 2003, 2005a; Black *et al.*, 2007, 2009; Grijalva, datos no publicados) que permiten tener una idea del riesgo de transmisión en determinadas áreas.

Se hace necesaria una nueva revisión sobre la situación epidemiológica de la ECh en Ecuador, que incluya los datos de investigaciones recientes y un análisis sobre el estado actual de las diferentes zonas de riesgo.

3.4. ELEMENTOS DE LA TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

3.4.1. INSECTOS VECTORES: TRIATOMINOS

Los triatominos, pertenecen al orden Hemiptera, a la familia Reduviidae y a la subfamilia Triatominae. Estos vectores son hematófagos obligatorios y pasan por cinco estadios ninfales antes de llegar a la etapa adulta, y este proceso, dependiendo de la especie, dura alrededor de 6 meses (Noireau *et al.*, 2009, Villacís y Grijalva, 2009). Morfológicamente, sólo los adultos tienen alas. Estas características biológicas son importantes a nivel epidemiológico, debido a que al ser hematófagos obligatorios, tanto las ninfas como los adultos, independientemente del género, son potenciales transmisores de *T. cruzi*. Además, la presencia de ninfas, por su incapacidad de volar, es un indicador de colonización de triatominos en un área o hábitat determinado.

Se han identificado un total de 140 especies de triatominos (6 tribus, 18 géneros), distribuidos principalmente en América (Schofield y Galvao, 2009). A pesar de que todos

los triatomíneos fueron originariamente silvestres, sólo pocos pudieron colonizar exitosamente los ambientes domiciliar y peridomiciliar, por lo que únicamente tres géneros son de importancia en la transmisión humana de la ECh (*Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*), siendo poco conocido el rol de otros géneros de triatomíneos en la transmisión de *T. cruzi* en ambientes silvestres (Noireau *et al.*, 2009).

En el ambiente silvestre hay una circulación continua de *T. cruzi* entre triatomíneos y mamíferos; sin embargo, la expansión territorial humana causó la destrucción de los biotopos naturales de los triatomíneos y favoreció el proceso de adaptación para la colonización de zonas domiciliarias y peridomiciliarias (Noireau *et al.*, 2009). Como resultado, el ser humano pasó a ser una fuente accidental de alimento para los triatomíneos. El éxito de los programas de control en los países del sur de América del Sur radica en la baja diversidad de especies de triatomíneos y en la eliminación de especies adaptadas a los ambientes de domicilio con poblaciones selváticas menores (Schofield *et al.*, 1999). Sin embargo, en los últimos años, se han reportado procesos de re-infestación causados por la dispersión pasiva de especies sinantrópicas o por la invasión de poblaciones selváticas (Carbajal de la Fuente *et al.*, 2007; Costa y Lorenzo, 2009). En el caso del norte de América del Sur, la situación es diferente. Hay una mayor diversidad de triatomíneos asociados con asentamientos humanos, lo que hace que no solo los vectores primarios (Ej: *T. dimidiata*, *T. infestans*, *R. prolixus*) deban ser considerados en los programas de control, sino también los vectores secundarios (Ej: *T. brasiliensis*, *T. rubrovaria*, *T. guasayana* y *R. ecuadoriensis*) que son capaces de colonizar estructuras domiciliarias y ambientes peridomésticos en ausencia de las especies primarias (Almeida *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2003; Vazquez-Prokopec *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2008; Grijalva *et al.*, 2005).

Para entender la interacción del vector con *T. cruzi*, es importante conocer los aspectos biológicos y ecológicos del vector. Sin embargo, también es importante conocer los mecanismos moleculares y bioquímicos que influyen en la viabilidad del parásito dentro del vector y la capacidad de los triatomíneos para transmitir el parásito, entre otros factores.

3.4.2. MAMÍFEROS RESERVORIOS

El escenario epidemiológico de la transmisión de *T. cruzi* es complejo y abarca una amplia diversidad de mamíferos involucrados. Se ha detectado la presencia de este parásito en al menos 100 especies de mamíferos que pertenecen a siete órdenes diferentes: Marsupiales, Chiroptera, Rodentia, Lagomorpha, Edentata, Carnívora y Primates (Zeledon, 1974). Su importancia va más allá de ser considerados depósitos del parásito, ya que son organismos con un rol activo en la dispersión y conectividad de los ciclos de transmisión, además de ser ambientes en los que el parásito sufre una presión selectiva (Noireau *et al.*, 2009). Actualmente, se define a un reservorio como una especie o grupo de especies responsables del mantenimiento, a largo plazo, de un parásito en un ambiente determinado (Ashford, 1996).

Los mamíferos de América tienen una larga historia de asociación con el parásito, aproximadamente de 38 millones de años, y han estado expuestos a un proceso de co-evolución que ha producido una atenuada patogenicidad (Schofield, 2000; Rozas *et al.*, 2007). Los mamíferos reservorios ancestrales de *T. cruzi* son los marsupiales y los xenarthra (armadillos y osos hormigueros), en especial su relación con los marsupiales del género *Didelphis* que actúa como reservorio y tienen la capacidad de mantener parásitos de *T. cruzi* en las glándulas anales (Noireau, *et al.*, 2009). Actualmente, se cree que el género

Didelphis juega un rol importante en la transmisión humana de la ECh, debido a su capacidad de mantener infecciones con *T. cruzi* con altas parasitemias y por largos periodos, así como su facilidad de adaptación a ambientes intervenidos (domicilio y peridomicilio).

Los roedores son también importantes reservorios por sus hábitos sinantrópicos, su abundancia y su capacidad de dispersión. Estudios previos han demostrado la infección de roedores con distintos linajes de *T. cruzi* e incluso infecciones mixtas con diferentes linajes (Xavier *et al.*, 2007, Rozas *et al.*, 2007). Sin embargo, su rol en la transmisión parece estar definida por las características específicas de cada área.

En otros mamíferos, como los murciélagos (Lisboa *et al.*, 2008), armadillos (Yeo *et al.*, 2005), y otros carnívoros como *Nassua nassua* (coati) (Herrera *et al.*, 2008) y *Procyon lotor* (mapache) (Hancock *et al.*, 2005), también se ha detectado la presencia de varios linajes de *T. cruzi*.

Roellig *et al.*, 2010 realizaron infecciones experimentales con cuatro linajes de *T. cruzi* (TcI, TcII (TcIIb), TcIII (TcIIe) y IV (TcIIa)) en una especie de mamífero placentario (*Octodon degus*) y un marsupial (*Monodelphis domestica*), para determinar la tendencia observada en trabajos de campo en la que los mamíferos placentarios son reservorios más competentes para las cepas TcII-TcIV, mientras que los marsupiales lo serían para TcI. Este estudio demostró que ambas especies son susceptibles de infección para todas las cepas tratadas, excepto TcIV (TcIIa) en marsupiales (aunque si existen reportes de infección natural de mamíferos con esta cepa en Sudamérica). Sin embargo, la dinámica de la infección es diferente entre las distintas cepas del parásito, por lo que, si bien este estudio confirma que el parásito está circulando activamente en ambientes silvestres y que estos

mamíferos, además de ser reservorios, pueden tener un rol en la dispersión de los diferentes linajes del parásito, su nivel de influencia no está claramente establecido (Roelling *et al.*, 2010).

Hasta el momento no se ha encontrado asociación entre un determinado genotipo de *T. cruzi* y una especie o grupo de mamífero, lo que sugiere que son las características epidemiológicas de una región las que determinan el rol de los mamíferos en la transmisión de la ECh (Noireau *et al.*, 2009).

3.4.3. AGENTE CAUSAL: *T. cruzi*

T. cruzi es un protozooario unicelular que pertenece a la familia Trypanosomatidae del orden Kinetoplastida. Es un parásito obligatorio que se caracteriza, como el resto de trypanosomátidos, por tener un solo flagelo y un kinetoplasto pequeño. Los trypanosomátidos parasitan toda clase de vertebrados así como invertebrados, especialmente insectos del orden Díptera y Hemíptera (Maslov *et al.*, 2001). Al igual que otros organismos del orden kinetoplastida, su ADN mitocondrial es una estructura formada por una red de minicírculos y maxicírculos conocida como kinetoplasto (De Souza, 1999). Se puede diferenciar los diferentes estadios morfológicos del parásito de acuerdo a la posición de esta organela con respecto al núcleo y la presencia del flagelo (Miles, 2009). Además el análisis molecular del ADN de la región del minicírculo del kinetoplasto (kADN), que tiene aproximadamente 30 000 copias, permite una alta sensibilidad para detectar la infección con *T. cruzi* y/o *T. rangeli* en muestras provenientes de insectos vectores, mamíferos reservorios (Vallejo *et al.*, 1999) y humanos (Britto *et al.*, 1995). Los detalles de la biología de *T. cruzi*, su diversidad genética e influencia como agente causal de la ECh serán analizados en las siguientes secciones.

3.5. EL PARÁSITO *T. cruzi*

3.5.1. BIOLOGÍA Y CICLO DE VIDA

T. cruzi es el agente causal de la ECh y tiene un complejo ciclo de vida en el que se involucra tanto a mamíferos como a sus vectores invertebrados. Estas complejas interacciones implican adaptaciones morfológicas y fisiológicas que le permita reproducirse y establecerse en dos ambientes con condiciones diferentes. En el mamífero, la replicación de *T. cruzi* se produce en un ambiente intracelular, mientras que en el insecto vector, se lleva a cabo en el intestino medio. Estas características biológicas son las que influyen tanto en la patogénesis como en el tipo de respuesta inmune frente a la infección (Miles, 2009).

Durante el ciclo de vida de *T. cruzi*, se producen varios cambios morfológicos y fisiológicos característicos de cada etapa. El estadio infectivo del parásito es el tripomastigote metacíclico y se encuentra en las heces de los triatominos (Figura 2a). El ingreso al mamífero se produce mecánicamente por abrasión o por contacto con las mucosas, y en algunos casos por la ingesta de triatominos (Figura 2b). Una vez que el parásito ingresa al torrente sanguíneo, infecta células fagocíticas y no fagocíticas, pierde el flagelo (amastigote), escapa de la vacuola fagocítica y se multiplica en el citoplasma por fisión binaria formando pseudoquistes (Figura 2c) que posteriormente se rompen y liberan parásitos al medio extracelular. En la fase aguda, esta multiplicación puede causar lesiones conocidas como chagomas o signo de Romana, si es una infección ocular. En los pseudoquistes se forman dos tipos de tripomastigotes, uno altamente activo que se encuentra en el torrente sanguíneo únicamente en las infecciones agudas y cuya función se basa en infectar nuevas células (Figura 2d); y otra forma más pequeña y menos móvil que

es la más común en torrente sanguíneo y es la ingerida por el vector (Figura 2e). Dentro del vector, 10 a 15 días después de la ingestión de la sangre infectada, los tripomastigotes pasan al estadio epimastigote (Figura 2f) para multiplicarse por fisión binaria (Figura 2g) y posteriormente, en el intestino posterior, vuelven al estadio infectivo de tripomastigote (Figura 2h) (Miles, 2009).

3.5.2. DIVERSIDAD GENÉTICA DE *T. cruzi*

Desde la descripción de *T. cruzi* en 1909, por Carlos Chagas, el conocimiento sobre este parásito ha incrementado de forma exponencial. Este parásito muestra una gran plasticidad y es altamente variable. Las diferencias morfológicas en las formas sanguíneas ya fueron descritas desde 1909, posteriormente se describieron diferencias biológicas e inmunológicas (Murta y Romanha, 1999). Desde los años 70 se ha tratado de clasificar a *T. cruzi*. La primera clasificación se realizó en base a la diferencia entre patrones enzimáticos y se definió dos grupos o zimodemas principales (Z1 y Z2) y un tercer zimodema (Z3) que no estaba claramente definido (Miles *et al.*, 1977); sin embargo, con el incremento en la diversidad de muestras, en relación a hospederos y áreas geográficas, esta metodología evidenció una variabilidad más extensa y se encontraron patrones electroforéticos heterogéneos (Tibayrenc *et al.*, 1986). A pesar de que esta metodología no permite detectar toda la variabilidad intrínseca en el parásito, la clasificación en los mayores grupos de *T. cruzi* es aún válida. Los siguientes esfuerzos se enfocaron en la variabilidad genética, debido a que el determinar los subgrupos relevantes dentro de la población se hacía necesario para comprender la historia evolutiva de este parásito; además, esta información es importante para vincular la variabilidad con las relaciones genéticas entre poblaciones de parásitos y así entender la forma en la que se llevan a cabo los procesos de transmisión. Estudios posteriores, analizando los genes de ARN ribosomal y mini-exón, confirmaron la

presencia de dos ramas principales TcI y TcII (Souto *et al.*, 1996) que correspondían a los principales zimodemas descritos previamente por Miles *et al.* (1977).

En el año 2000, Brisse *et al.* identificaron seis unidades discretas de tipificación (Discrete Typing Units ó DTUs por sus siglas en inglés): DTU I, DTU IIa-DTU IIe. Esta nueva clasificación incluía dos linajes híbridos (DTU II d y DTU II e), que se habían estabilizado en el tiempo debido a la subsecuente propagación clonal. Estos dos grupos son considerados linajes, a pesar de que al ser híbridos no cumplen con el concepto de clados y tienen múltiples ancestros (Tibayrenc, 2003). Estudios más detallados revelaron que DTU I y DTU II b eran los linajes ancestrales y que los linajes híbridos DTU II d y DTU II e eran el producto de al menos dos eventos de hibridización (Westenberger *et al.*, 2005), mientras que la evolución de los linajes DTU II a y DTU II c aún no es clara, aunque no se descarta que también tengan un origen híbrido (Sturm *et al.*, 2003).

Todos estos nuevos conocimientos acerca de la variabilidad genética de *T. cruzi* llevaron a que se realice una reunión, en agosto del 2009, para estandarizar la nomenclatura utilizada para distinguir a los seis linajes del parásito. Esta nueva nomenclatura reconoce los seis linajes previamente descritos y los nombra en forma secuencial de TcI a TcVI (Zingales *et al.*, 2009), los detalles de la correspondencia de las distintas nomenclaturas anteriores con la nomenclatura actual se resume en la Tabla 1).

3.5.3. DINÁMICA DE LA TRANSMISIÓN DE LOS LINAJES DE *T. cruzi*.

La importancia de la variabilidad de *T. cruzi* radica en entender el significado epidemiológico de los distintos linajes en relación a la ECh. Varios estudios han tratado de encontrar las relaciones epidemiológicas de algunos linajes con el origen de su hospedero y

su origen geográfico (Yeo *et al.*, 2005; Llewellyn *et al.*, 2009a, 2009b), su ciclo de transmisión (Falla *et al.*, 2009) e incluso con la patogénesis de la enfermedad y la forma de transmisión (Corrales *et al.*, 2009; Diez *et al.*, 2010). Sin embargo, algunas limitantes como el tamaño del muestreo y diversidad de los aislados analizados no han permitido elucidar las relaciones con todos los linajes.

En el norte de América del Sur, el linaje TcI es predominante tanto en vectores, y reservorios, como en casos humanos (Bosseno *et al.*, 2002; Añez *et al.*, 2004; Herrera *et al.*, 2007; Pennington *et al.*, 2009). Este linaje se ha asociado con ambientes arborícolas y en especial con marsupiales del género *Didelphis* y vectores del género *Rhodnius* (Yeo *et al.*, 2005), sin embargo, no se encuentra restringido. En cuanto a su relación con la patología de la ECh, se asocia la presencia de TcI con la cardiopatía chagásica, lo que explicaría la poca frecuencia de lesiones digestivas (megaesófago y megacolon) en el norte de América del Sur (Miles *et al.*, 2009). Mediante el análisis de microsatélites se ha observado que dentro de este linaje hay una estructura relacionada con la distribución geográfica en la que se evidencian potenciales eventos fundadores que podrían estar relacionados con casos crónicos (Llewellyn, *et al.*, 2009a). La variabilidad genética dentro de este genotipo ha sido analizada mediante secuenciación del mini-exón y se ha encontrado una asociación entre los haplotipos del linaje TcI con los diferentes ciclos de transmisión (domicilio, peridomicilio y silvestre) (Herrera *et al.*, 2007, O'Connor *et al.*, 2007; Falla *et al.*, 2009).

El linaje TcII (TcIIb), junto con TcV (TcIIId) y TcVI (TcIIe), son los principales agentes de la ECh en el sur de América del Sur, y están asociados principalmente a *T. infestans*, el principal vector transmisor en esa área en donde los casos de megaesófago y megacolon son más comunes (Miles *et al.*, 2009). La relación de este linaje con un nicho

ecológico específico no es claro (Miles *et al.*, 2009), sin embargo, se ha encontrado cierta relación con mamíferos de hábitos terrestres (Yeo *et al.*, 2005).

El linaje TcIII (TcIIc) tiene una distribución amplia a lo largo de América (desde el este de Venezuela hasta el Chaco Argentino) (Llewellyn *et al.*, 2009b), está asociado con el nicho ecológico terrestre, especialmente asociado a armadillos (*Dasypus*, *Euphractus*) (Yeo *et al.*, 2005; Marcili *et al.*, 2009) y vectores de los géneros *Panstongylus* y *Triatoma* (Miles *et al.*, 2009). Este linaje ha sido raramente asociado a casos humanos y se ha reportado casi exclusivamente en ambientes silvestres. Sin embargo, es considerado como un potencial causante de casos emergentes de la ECh además de ser uno de los linajes parentales de otros linajes híbridos (TcV y TcVI) (Miles *et al.*, 2009).

El linaje TcIV (TcIIa) es uno de los menos conocidos y no hay una relación clara con un nicho ecológico definido ya que ha sido aislado tanto de mamíferos de hábitos terrestres como armadillos tanto como de primates y de vectores del género *Rhodnius* (Marcili *et al.*, 2009). Este linaje es endémico de América del Norte y se ha visto que tiene diferencias con muestras del mismo linaje pero aisladas en América del Sur, sin embargo, la influencia de este linaje en la epidemiología de la ECh no ha sido determinada (Miles *et al.*, 2009).

Finalmente, los linajes TcV (TcII d) y TcVI (TcII d) son el resultado de eventos de hibridización entre TcI y TcIII (TcIIc) (Westenberger *et al.*, 2005), aparentemente se encuentran restringidos al ciclo domiciliar en las zonas de Bolivia, Chile, Argentina y Paraguay, asociadas con *Triatoma infestans* (Miles *et al.*, 2009). Ambos linajes han sido encontrados en pacientes con megaesófago y megacolon (Carranza *et al.*, 2009) y ligado a la transmisión congénita (Corrales *et al.*, 2009).

3.5.4. GENÉTICA DE POBLACIONES DE PARÁSITOS

Los parásitos son modelos ideales para comprender los procesos de diversificación y especialización tanto a niveles macro como micro-evolutivos. Uno de los primeros pasos es identificar los procesos evolutivos que promueven la especiación de los parásitos y, a menor escala, revelar la información genética que nos permita comprender la forma de dispersión y la dinámica de sus poblaciones (Huyse *et al.*, 2005). Estos organismos son de especial interés debido a su exitosa forma de vida; todas las especies de animales están infectadas por al menos un tipo de parásito. En este sentido, es de nuestro particular interés el conocer la dinámica y genética de poblaciones de parásitos que causan enfermedades humanas. Si bien en la franja norte del planeta la primera causa de mortalidad lo constituyen las enfermedades cardíacas, en las zonas templadas y del trópico, las enfermedades causadas por parásitos son las responsables de los altos índices de mortalidad y morbilidad (Grayson and Wesselingh, 2002). Varias de las enfermedades que tienen severas implicaciones médicas y económicas son causadas por parásitos clonales (*T. cruzi*-ECh, *Leishmania spp.*-Leishmaniasis, *T. brucei*-Trypanosomiasis africana) y el conocimiento de la genética de las poblaciones de estos parásitos permite conocer la dinámica de la transmisión.

A continuación se van a considerar algunos de los conceptos básicos sobre genética de poblaciones de organismos diploides clonales como *T. cruzi*, que nos permitirán interpretar los resultados obtenidos en este estudio.

3.5.4.1. DIVERSIDAD GENÉTICA: RIQUEZA ALÉLICA Y ALELOS EXCLUSIVOS

La diversidad genética es uno de los parámetros más importantes para conocer el estado de las poblaciones. Una alta diversidad genética permite que las poblaciones sean más aptas para responder a las fuerzas selectivas. La medida básica de la diversidad genética es la riqueza alélica (A_r), conocida también como diversidad genética ó el número medio de alelos por locus. La A_r permite detectar si una población ha pasado por un proceso selectivo y está en una etapa de “cuello de botella”. Un dato estadístico relacionado con la A_r es el número de alelos exclusivos, es decir, los alelos que se encuentran únicamente en una población dada. Ambas medidas presentan un problema relacionado al tamaño de la muestra. En una muestra grande se espera que haya más alelos y por lo tanto más alelos exclusivos que en muestras pequeñas (Leberg, 2002; Kalinowski, 2004). A pesar de estos problemas, estas medidas nos dan una importante idea de la variabilidad genética en una población.

3.5.4.2. EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG

El principio de Hardy-Weinberg describe el contenido genético de poblaciones diploides en términos de frecuencias alélicas. Estima la frecuencia o proporción (p y q) de dos alelos (dominante A y recesivo a) en una generación que es el resultado de una reproducción parental aleatoria y que se refleja en las siguientes proporciones: $AA = p^2$, $Aa = 2pq$, $aa = q^2$. En base a estos valores se puede calcular la heterocigocidad esperada (H_E). Sin embargo, el cumplimiento de este principio basa en los siguientes supuestos: a) organismo diploide, b) se reproduce sexualmente, c) se aparea aleatoriamente con otros individuos de la población, d) la población es infinita, e) no sufre mutación; f) no hay

selección natural, g) no hay migración. Cuando una población presenta los genotipos de las frecuencias muy similares a las de la generación previa, se sugiere que la población ha alcanzado una condición estable o un equilibrio Hardy-Weinberg. Sin embargo, en condiciones naturales, estos supuestos no son reales y estas desviaciones afectan el valor de la heterocigocidad observada (H_O) (Hartl, 2000; Page y Holmes, 1998).

3.5.4.3. MEDIDA DE LIGAMIENTO DE LOCI: DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO E ÍNDICE DE ASOCIACIÓN

El desequilibrio de ligamiento (linkage disequilibrium) es un valor que permite medir el grado de recombinación. Si la recombinación entre los alelos es aleatoria y todos tienen la misma probabilidad de combinación dentro de una población, los loci están en un estado de equilibrio de ligamiento. El grado de desequilibrio de ligamiento (D) se calcula en base a la frecuencia de una combinación determinada de alelos. Cuando una población tiene un $D=0$, o muy cercano a cero, significa que la población está en equilibrio de ligamiento y que hay recombinación aleatoria incluso en genes cercanamente relacionados. Por otro lado, si existe una desviación de esta expectativa, entonces se asume que los dos alelos están ligados y hay un desequilibrio de ligamiento (DL) (Page y Holmes, 1998). Este ligamiento físico entre loci puede darse por una selección natural favorable, una tasa de clonación significativa, porque la población no ha alcanzado el equilibrio desde el último disturbio (ej: cuello de botella) o por una subestructura de la población (De Meeus *et al.*, 2006).

El índice de asociación (I_A) es otra medida del grado de ligamiento. Al igual que el desequilibrio de ligamiento, si los loci están asociados aleatoriamente entonces $I_A=0$, es

decir que el desequilibrio de ligamiento va disminuyendo progresivamente con el incremento de la tasa de reproducción sexual (de Meeus *et al.*, 2006). En el caso de los organismos clonales, la ausencia de recombinación genera una asociación estadística y equivale a un ligamiento físico absoluto a lo largo de todo el genoma; esto se refleja en una disminución en la diversidad de genotipos multilocus (de Meeus *et al.*, 2006).

3.5.4.4. ESTRUCTURA POBLACIONAL Y ESTADÍSTICAS F

Teóricamente, las poblaciones de una especie en particular pueden cruzarse libremente. Sin embargo, las poblaciones en estado natural son más complejas, no tienen una estructura definida y no se distribuyen, ni geográfica ni genéticamente, en forma uniforme. Las poblaciones suelen agruparse y formar subpoblaciones que están aisladas unas de otras; el efecto genético más importante es que evita que se produzca la panmixia (cruce libre y aleatorio). A pesar del relativo aislamiento de las poblaciones, los genes suelen moverse de una subpoblación a otra en un proceso conocido como flujo genético, el cual introduce variabilidad genética en la población y evita la especiación debido a que tiende a homogenizar las frecuencias de alelos. “En la naturaleza, las poblaciones están expuestas a un balance entre dos fuerzas opuestas: la disminución de diversidad dentro de poblaciones con un incremento de diversidad entre ellas causada por la deriva génica, y el incremento de la diversidad dentro de las poblaciones con una reducción de diversidad entre ellas causada por el flujo génico” (Page y Holmes, 2008).

El análisis de la genética de poblaciones es útil para clasificar individuos de una muestra dentro de poblaciones y esto es un paso crucial para definir el grupo de subpoblaciones, tomando en cuenta que esta clasificación debe ser consistente con la información genética (Pritchard *et al.*, 2000).

La estructura de la población va a estar definida básicamente en el grado de cruzamiento y el flujo genético. La variación en los valores de heterocigocidad observados y los esperados bajo el principio de Hardy-Weinberg, son la señal de que uno de estos procesos está ocurriendo. La medida de la frecuencia de ocurrencia de estas variaciones son los estadísticos F . Estos estadísticos asumen 3 niveles de estructura en una población: individual (I), subpoblaciones (S), y población total (T). La combinación de estos tres niveles da una descripción detallada de la estructura de la población (Page y Holmes, 2008).

El estadístico F_{ST} se usa para medir el grado de subdivisión, es decir, la relación entre individuos debido a la presencia de una estructura poblacional (diferentes subpoblaciones). Cuando este valor es cero indica que los individuos entre las sub-poblaciones se distribuyen aleatoriamente. Mientras que, si este valor es +1 es indicio de separación de grupos y fijación de alelos en cada población (de Meeus *et al.*, 2006).

El estadístico F_{IS} mide el nivel de endogamia como resultado de una desviación del valor esperado en panmixia (cruce randómico); este valor puede variar entre -1 (todos los individuos son heterocigotos para el mismo par de alelos), 0 (distribución aleatoria de alelos dentro del individuo) y +1 (todos los individuos son homocigotos) (de Meeus *et al.*, 2006).

Finalmente, el estadístico F_{IT} da una medida de la endogamia de los individuos como resultado tanto de la unión no aleatoria de gametos como del tipo de estructura de la población, es decir, mide la desviación de la panmixia de todos los individuos del total de la población (de Meeus *et al.*, 2006).

3.6. MARCADORES MOLECULARES USADOS EN ESTE ESTUDIO

3.6.1. REGIÓN HIPERVARIABLE DEL MINICÍRCULO DEL KINETOPLASTO PARA LA DETECCIÓN DE INFECCIÓN POR TRIPANOSOMÁTIDOS: *T. cruzi* y *T. rangeli*)

El kinetoplasto contiene ADN extra-nuclear formado por minicírculos y maxicírculos cuya función es la de codificar proteínas ribosómicas y enzimas mitocondriales (De Souza *et al.*, 1999). Los minicírculos están formados por cuatro regiones conservadas y cuatro regiones hipervariables. La variabilidad de las regiones hipervariables, y el alto número de repeticiones en el genoma (aprox. 30 000 copias) hace a esta región un buen candidato para la determinación de la infección con *T. cruzi* y/o *T. rangeli* en muestras de campo en donde la sensibilidad del marcador utilizado es importante. Empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los primers S35 y S36, para *T. cruzi* se espera una banda típica de 330 pb, mientras que *T. rangeli* amplifica un fragmento de 760 pb y un set de productos que varían de 300 pb a 450 pb (Vallejo *et al.*, 1999).

3.6.2. DETERMINACIÓN DE LINAJES

Como se había mencionado anteriormente, *T. cruzi* posee alta diversidad genética y se han usado una gran cantidad de marcadores para poder identificar los linajes de este parásito. Esto causó que exista una amplia gama de nomenclaturas y que no haya estandarización de los métodos de caracterización, por lo que en muchos casos la comparación de resultados resulta complicada. Mediante varios marcadores genéticos se determinó, de forma consistente, la clasificación de seis DTUs y el siguiente paso fue

estandarizar un protocolo para la caracterización de *T. cruzi*. Lewis *et al* (2009) probaron cinco ensayos que en forma independiente permiten distinguir todos los DTUs de *T. cruzi* y seleccionaron tres ensayos (dominio divergente D7 del gen 24S α de rARN, gen *hsp60* y gen *gpi*), que usados en combinación identifican los seis DTUs. Este fue el protocolo seleccionado para la caracterización del linaje de *T. cruzi* en este estudio.

3.6.2.1. DOMINIO DIVERGENTE D7 DEL GEN 24S α DE rARN

Los genes que codifican para el ARN ribosomal (rRNA) han sido uno de los principales marcadores utilizados para caracterizar *T. cruzi* (Souto *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1999; Brisse *et al.*, 2001; Mendonça *et al.*, 2001; Stolf *et al.*, 2003). En esta especie se ha encontrado 110 unidades de transcripción repetidas en tándem (Souto *et al.*, 1993) y mediante el análisis de los polimorfismos de los fragmentos de amplificación (FLP) del dominio divergente D7, se ha podido definir tres grupos dentro de *T. cruzi*: el grupo rADN 1 (125 pb), correspondiente al linaje TcII y TcVI, el grupo rADN 2 (110 pb), correspondiente al linaje TcI y TcIII, y el grupo híbrido rADN 1/2 que presenta ambas bandas (125 pb y 110 pb) y corresponde al linajes TcV (Souto *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 2009). El linaje TcIV presenta alta variabilidad en los tamaños de bandas y varía entre 117, 120, 125 o 130 pb (Lewis *et al.*, 2009).

3.6.2.2. GEN DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO (*hsp60*)

El gen *hsp60* codifica para la proteína de shock térmico de 60-kDa. Forma parte de una familia de genes que se activan como respuesta a temperaturas elevadas y cuya función es la de mantener el estado de homeostasis de las células. En organismos como *T. cruzi*, estos genes le permiten a la célula adaptarse a los cambios de ambiente (de vector a

hospedero) (Folgueira y Requena, 2007) y ha sido utilizado para caracterizar las poblaciones de *T. cruzi* por ser conservado. La ventaja de caracterizar este gen es que al no encontrar muchos productos no específicos, la digestión se puede hacer directamente de los productos de PCR sin necesidad de purificación. El tamaño de los productos de digestión es variado, sin embargo siguen un patrón definido; para los linajes TcI, TcII y TcIV se observa una sola banda (432 pb o 462 pb), para TcIII dos bandas (314 pb+148 pb-118 pb), TcV y TcVI presentan tres bandas (432 pb-462 pb+314 pb+148 pb-118 pb) (Lewis *et al.*, 2009).

3.6.2.3. GEN DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO ISOMERASA (*gpi*)

Este gen pertenece a la familia GPI, que codifica para enzimas involucradas en los procesos de generación de energía. La glucosa-6-fosfato isomerasa es una proteína involucrada tanto en la glicólisis como en la gluconeogénesis (Cordeiro *et al.*, 2004). Este es un gen conservado y, en *T. cruzi*, a permitido identificar DTUs que son producto de la hibridización de linajes. Su ventaja sobre otros marcadores, y al igual que *hsp60*, es que no necesita el paso de purificación para su análisis y tiene patrones claros para la diferenciación de los diferentes DTUs. Para los linajes TcI y TcIII se observa dos bandas en los productos de digestión (817 pb+447 pb), TcII y TcIV presentan tres bandas (490 pb+447 pb+253 pb), mientras que en los linajes TcV y TcVI hay cuatro productos de digestión (817 pb+490 pb+447 pb+253 pb) (Lewis *et al.*, 2009).

3.6.3. ANALISIS DE MICROSATÉLITES

Los microsatélites son pequeñas secuencias de 2-5 pb que se repiten en tándem en el ADN nuclear. Estas secuencias no son codificantes y su ventaja para el análisis genético

es que son abundantes en el genoma, hiper-variables, co-dominantes (Page y Holmes, 2008) y su poder discriminatorio se incrementa cuando se analizan varios loci.

Los microsatélites tienen una alta tasa de mutación, el realizar el análisis de estas mutaciones en las diferentes poblaciones es de vital importancia para poder realizar inferencias sobre la estructura genética de las mismas. Se han descrito varios modelos evolutivos asumiendo la neutralidad de los loci de microsatélites, en los que no hay presiones selectivas debido a que no son secuencias codificantes. El modelo de los alelos infinitos (infinite allele model o IAM); relaciona el proceso de mutación con la deriva génica y asume que cada mutación genera un nuevo alelo y en este caso se puede predecir cuántos alelos se crearon o perdieron a causa de la deriva génica (Page y Holmes, 2008). Otro modelo evolutivo es el modelo de mutación gradual (stepwise mutation model o SMM) en donde, con el tiempo, las mutaciones incrementan o disminuyen el tamaño de los alelos en unidades repetitivas (Page y Holmes, 2008).

Los microsatélites han sido ampliamente utilizados para determinar la estructura genética de las poblaciones de *T. cruzi*. Los primeros estudios que emplearon esta técnica confirmaron que este parásito es un organismo diploide con propagación clonal (con sexualidad rara o ausente), además de que se evidenció multiclonalidad en muestras de un mismo linaje (Oliveira *et al.*, 1998, 1999). Este nivel de variabilidad dentro de los linajes llevó a utilizar esta técnica a niveles más específicos, lo que fue posible con la finalización del proyecto del genoma de *T. cruzi*. El en año 2009, Llewellyn *et al.* desarrollaron un panel de microsatélites para analizar la dinámica poblacional de aislados de TcI y TcIII. Estos estudios permitieron tener importante información epidemiológica especialmente al comparar poblaciones domiciliadas y selváticas del parásito y hacer

inferencias sobre la influencia de esta variabilidad intra-linaje en la dinámica de la transmisión de la ECh.

3.7. OBJETIVO

El conocer la dinámica poblacional de un parásito con un ciclo de vida tan complejo como *T. cruzi* requiere la inclusión de la mayor variabilidad posible. En Ecuador, se ha confirmado que *T. cruzi* se encuentra circulando activamente tanto en reservorios como en vectores en provincias endémicas para la ECh y, en el caso de Loja y Manabí, existen altos índices de infestación con triatominos en los ambientes de domicilio, peridomicilio y silvestre. Estas características implican un alto riesgo de transmisión de la ECh, en dichas áreas, por lo que obtener información sobre la dinámica de las poblaciones de *T. cruzi* a una escala geográfica pequeña (provincia de Loja y cantón Portoviejo en Manabí), es de suma importancia para determinar las características locales de transmisión de la ECh que se están llevando a cabo en estas áreas.

3.7.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este estudio fue caracterizar, a nivel de genético, los linajes de *T. cruzi* que circulan en mamíferos y vectores de la ECh en las dos zonas de estudio y conocer la dinámica poblacional del parásito en las mismas.

3.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el índice de infección con *T. cruzi* y *T. rangeli* en triatominos y mamíferos reservorios en comunidades de las provincias de Loja y Manabí.

2) Determinar los linajes de *T. cruzi* circulantes en triatomíneos y mamíferos.

3) Analizar la genética de poblaciones de *T. cruzi* tanto en Loja como en Manabí.

Esta información busca afrontar el hecho de que a) en Ecuador, la información sobre los linajes circulantes en insectos triatomíneos y mamíferos reservorios es muy limitada y, como consecuencia, no se han establecido relaciones epidemiológicas básicas para entender la dinámica de transmisión del parásito; b) hay evidencia de que *T. cruzi* está circulando activamente en los tres ciclos de transmisión de la ECh (domiciliar, peridomiciliar y silvestre), sin embargo, la dinámica de este parásito entre estos ambientes y el efecto de esto en la transmisión a humanos no ha sido determinada ; y c) los estudios de genética de poblaciones de *T. cruzi* han revelado importantes características de este parásito, sin embargo, este es uno de los primeros estudios realizados en una escala local, que busca además de conocer la dinámica de las poblaciones en regiones geográficas reducidas, conocer la estructura genética de un organismo complejo como *T. cruzi* que aún presenta varias interrogantes en cuanto a su forma de reproducción y plasticidad genética.

Finalmente, este estudio busca proveer un fundamento científico que sea considerado para la planificación y planteamiento de nuevas estrategias que permitan interrumpir la transmisión de la ECh en las zonas de estudio.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

Las provincias seleccionadas para este estudio fueron Manabí y Loja, las cuales son consideradas endémicas para la Enfermedad de Chagas y en donde se ha reportado la presencia de triatominos y mamíferos infectados con *T. cruzi* (Grijalva *et al.*, 2005a; Pinto *et al.*, 2006; Grijalva y Villacís, 2009; Suarez-Davalos *et al.*, 2010).

4.1.1. MANABÍ

La provincia de Manabí se encuentra ubicada en la costa central de Ecuador y comprende ocho regiones ecológicas que se encuentran en un rango de 0 a 800 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.). Búsquedas entomológicas sistemáticas se realizaron en de 10 comunidades de esta provincia, y además se incluyó el análisis de triatominos reportados en la comunidad Naranjo Adentro. La captura de mamíferos se realizó en cuatro de estas comunidades (Tabla 2). Todas las comunidades pertenecen al cantón Portoviejo y se encuentran dentro de las zonas ecológicas que corresponden al bosque deciduo y al bosque semi-deciduo.

4.1.1. LOJA

La provincia de Loja se encuentra en el sur de Ecuador y se identifican seis zonas ecológicas entre los 0 y 2 900 m.s.n.m. dentro de ella. Las zonas en donde se realizaron las capturas de triatominos y mamíferos son zonas que se encuentran bajo los 2 200 m.s.n.m.

(bosque decido, bosque semi-decido, matorral seco y bosque siempre verde), debido a que éstas son las zonas de distribución de los vectores de la ECh en esta provincia. Se visitaron 92 comunidades en los 16 cantones, y las muestras incluidas en este estudio provienen de 44 de estas comunidades, abarcando 10 cantones. Para los mamíferos, se realizaron colecciones en 19 de estas comunidades abarcando nueve cantones (Tabla 2).

4.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

La captura tanto de mamíferos como de triatominos se llevó a cabo en tres hábitats diferentes: domicilio (dentro de la casa), peridomicilio (alrededor de la casa en lugares asociados a actividades humanas) y silvestre (nidos de ratas, ratones, ardillas y aves) en lugares con al menos 20 metros de distancia de las viviendas.

4.2.1. BÚSQUEDA Y COLECCIÓN DE TRIATOMINOS

La colección de triatominos en los ambientes de domicilio y peridomicilio fue realizada mediante búsquedas activas con un esfuerzo de captura de una hora/hombre (Grijalva *et al.*, 2005a) (Figura 3). Cada vivienda en la comunidad fue visitada por personal de campo del Programa Nacional de Chagas con apoyo de personal del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIEI) de la Universidad Católica del Ecuador (PUCE), Ecuador y de la Universidad de Ohio, USA (OU). Previo al inicio de las actividades, se obtuvo el respectivo consentimiento informado del jefe de familia de cada vivienda, siguiendo los procedimientos aprobados por los comités de ética institucionales de la PUCE y de OU. Dentro de las casas, la búsqueda se concentró en las grietas de las paredes, detrás de cuadros o papel, camas, acumulaciones de ropa o material. En el área de peridomicilio, las búsquedas se realizaron en las acumulaciones de piedra, ladrillos,

madera, nidos de aves (gallinas, palomas) y cuartos para almacenamiento de productos de la cosecha. Como parte del protocolo del Programa Nacional de Chagas, si en una vivienda se encontró al menos un triatomino vivo, se procedió al rociar con el insecticida piretroide deltametrina a una concentración de 25 mg a.i./m² (ingrediente activo).

Los triatominos silvestres fueron colectados mediante búsquedas manuales en nidos de mamíferos (ratas, ratones y ardillas) y aves en árboles, arbustos y rocas (Suarez-Davalos *et al.*, 2010) y mediante trampas pasivas Noireau de cebo vivo (Noireau *et al.*, 2002).

Todos los individuos colectados fueron llevados a la Unidad de Entomología Médica del CIEI para la identificación de especies (basado en criterios morfológicos siguiendo las claves de Lent y Wyzodzinsky, 1979 y Carcavallo *et al.*, 1998) y estadios de desarrollo.

4.2.2. CAPTURA Y PROCESAMIENTO DE MAMÍFEROS

Los mamíferos pequeños fueron capturados mediante el uso de trampas Sherman (Sherman Co., Tallhassee, FL, USA) mientras que para los mamíferos medianos se usaron trampas Tomahawk (Tomahawk Life-traps Co., Tomahawk, WI, USA) (Pinto *et al.*, 2006) (Figura 4). Como cebo se usó una mezcla de atún, maíz molido ó mantequilla de maní y esencia de vainilla. En los ambientes de domicilio y peridomicilio, las trampas fueron colocadas en las esquinas de cuartos, cocinas y bodegas, y cerca de las acumulaciones de madera, ladrillos y árboles. Para realizar esta actividad se obtuvo consentimiento informado de los jefes de familia de las viviendas en las que se realizaron colecciones, siguiendo los protocolos aprobados por los comités de ética tanto de la PUCE como de OU. Para la captura de mamíferos silvestres, las trampas se colocaron en lugares de

tránsito de los animales (cerca de árboles y hoyos) y cubiertos con follaje. Para la captura de ardillas, se colocaron trampas en los vértices de las ramas de los árboles que tenían presencia de nidos de estos roedores. Las trampas fueron revisadas y el cebo cambiado todos los días. El esfuerzo de captura varió entre sitios de captura dependiendo de la diversidad del paisaje local y las facilidades para la colocación de las trampas.

Los animales capturados fueron llevados para su procesamiento, el mismo día, al laboratorio de campo levantado cerca de los sitios de captura, bajo el protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) de OU. Las carcasas de los especímenes que no pudieron ser identificados en el campo fueron llevadas al Museo de Zoología QCAZ de la PUCE para su posterior procesamiento e identificación.

4.3. AISLAMIENTO DE PARÁSITOS Y ANÁLISIS PARASITOLÓGICO

4.3.1. OBTENCIÓN DE AISLADOS DE TRIATOMINOS

Los triatominos fueron sumergidos, por 10 minutos, en la solución de White (0,025 gr. HgCl_2 , 0,65 g NaCl, 0,125 ml HCl concentrado, 25 ml de etanol absoluto (Panreac, Barcelona, España) y 75 ml de H_2O) para desinfectar su superficie y luego fueron lavados en solución salina estéril con antibióticos y antimicóticos (0,9% (p/v) NaCl, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicina, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-fluorocitosina). Se obtuvieron muestras tanto de heces como de contenido intestinal de cada insecto bajo condiciones de esterilidad. En el laboratorio de campo se utilizó la cámara RCK Rapid Containment kit (Germfree Laboratories, Ormond Beach, FL, USA), mientras que en el laboratorio del CIEI se trabajó dentro de una cámara de flujo laminar clase II, tipo A/B3 (Nuair, Plymouth, MN, USA). Para mantener la

esterilidad, las superficies internas de dichas cámaras fueron desinfectadas con alcohol al 70% (v/v) y expuestas a la luz ultra violeta por 10 minutos.

Las muestras de heces se obtuvieron presionando ligeramente el abdomen de los insectos desde el centro hacia el extremo mientras que para obtener el contenido intestinal se cortó con una tijera estéril el extremo distal del abdomen. Ambos tipos de muestras fueron recogidas con una micropipeta y una punta de 200 μ l estéril con filtro. Posteriormente, las muestras fueron homogenizadas en 400 μ l de tampón salina de fosfato (PBS) (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2) y colocadas en tubos de centrifuga de 2 ml para almacenamiento a -20°C hasta la extracción de ADN. Una alícuota de aproximadamente 10 μ l se examinó mediante microscopía directa bajo un lente de 40X. Se revisaron 40 campos y se calculó el número promedio de flagelados observados por campo. Los cubreobjetos de las placas en las que se observaron flagelados, fueron retirados y se dejó secar a temperatura ambiente (TA) para su posterior tinción, estas placas fueron almacenadas en el CIEI como registro. Además, una alícuota de aproximadamente 100 μ l fue inoculada en un tubo de cultivo de poliestireno con 2 ml de medio de cultivo de infusión de hígado y triptosa (LIT) (2,5% (p/v) infusión de hígado, 0,5% (p/v) triptosa, 68mM NaCl, 5,3mM KCl, 56,3mM Na₂HPO₄, 0,2% (p/v) dextrosa, 5% (v/v) FBS, 0,025 mg/ml de hemina, penicillina/estreptomicina (0,1 mg/ml), gentamicina (10 mg/ml), pH 7,4). Cada tubo de cultivo fue mantenido a TA en el campo y luego trasladados al CIEI y mantenidos en una incubadora a 25°C.

El transporte de los medios de cultivo se realizó en cajas de espuma flex, debidamente etiquetadas, siguiendo los protocolos de bioseguridad. Aproximadamente 200 μ l fueron almacenados en un criovial etiquetado que se almacenó a -20°C para obtener

ADN con el cual se determinó la presencia de tripanosomas mediante el método de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

4.3.2. OBTENCIÓN DE AISLADOS DE MAMÍFEROS

Los mamíferos capturados fueron transportados dentro de las jaulas al laboratorio de campo y fueron procesados dentro de las 24 horas siguientes a su captura. Todos los individuos fueron sacrificados usando una cámara previamente cargada con CO₂, siguiendo el protocolo aprobado por el IACUC de OU. El animal fue recostado sobre una mesa (debidamente cubierta con plástico para evitar el contacto directo entre los fluidos del animal y la mesa) y su torso desinfectado con alcohol al 70%. Se cortó y retiró una sección de piel del tórax para evitar la contaminación de la aguja y, con una jeringuilla de 3 a 10 ml, dependiendo del tamaño del animal, se procedió a tomar una muestra de sangre, entre 200 y 1 000 µl mediante punción cardíaca. Una alícuota de 20 µl fue colocada en un portaobjetos para detectar la presencia de flagelados mediante microscopía directa bajo un lente de 40X. En cada placa se examinaron 40 campos y se determinó el promedio de flagelados observados por campo. Otra alícuota de aproximadamente 200 µl fue inoculada en tubos vacutainer con 3 ml de LIT. Aproximadamente 200 µl fueron almacenados en crioviales, con EDTA, a -20°C para posteriormente obtener ADN y determinar la infección por tripanosomas mediante PCR. Como material de respaldo y para futuros análisis, no incluidos en este estudio, muestras de tejido de corazón, hígado y músculo estriado fueron colectados y son mantenidos en crioviales con alcohol al 100% a TA.

4.4. MANTENIMIENTO DE CULTIVOS

Bajo condiciones de esterilidad, dentro de la cámara de flujo laminar, los cultivos inoculados fueron revisados semanalmente bajo microscopía. Al igual que en el campo, se prepararon portaobjetos con alícuotas de los cultivos para revisión bajo lente de 40X. En cada placa se revisaron 40 campos. Los cultivos considerados positivos (con presencia de flagelados) fueron mantenidos mediante pasos seriales en nuevo medio de cultivo. Si la cantidad de parásitos era de entre 5 y 50 parásitos por campo, se inoculó a un tubo de cultivo de poliestireno con 2 ml LIT y se realizaron revisiones y cambios semanales. Posteriormente, estos cultivos se revisaron mediante microscopía directa. Una vez que las poblaciones de parásitos alcanzaron > 50 parásitos por campo, los cultivos fueron inoculados en frascos T25 (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA). En cambio, si la población inicial de flagelados sobrepasaba los 100 parásitos por campo, se realizó un cambio de cultivo directo a frascos T25 en 10 ml de medio de cultivo LIT con revisiones quincenales y cambios mensuales. Los cultivos inoculados en frascos T25 fueron revisados directamente mediante el microscopio invertido Nikon eclipse TS100 (Nikon Corporation Instruments Company, Tokio, Japan). Tanto la preparación de placas como los cambios a nuevo medio de cultivo fueron realizados bajo condiciones de esterilidad en la cámara de flujo laminar. Los cambios de cultivo se realizaron mediante la inoculación, con pipetas pasteur de vidrio estériles, de aproximadamente 500 μ l cultivo en el nuevo medio de cultivo. Los tubos y frascos de cultivo fueron mantenidos en una incubadora MO1450A (Lindberg-Blue, Asheville, NS, USA) a 25°C. Adicionalmente, una alícuota de 200 μ l de cada cultivo positivo fue separada en crioviales y mantenida a -20°C para la posterior obtención de ADN.

4.5. EXTRACCIÓN DE ADN

Se extrajo ADN del contenido intestinal de triatomíneos, el cual fue empleado para la determinación del índice de infección con tripanosomas. Una alícuota de 200 µl de las muestras de contenido intestinal fueron centrifugadas por 5 minutos a 9 500 gravedades en una microcentrífuga Eppendorf® 5415 (Brinkmann Instruments, Canada) y resuspendidas en 200 µl de PBS. El ADN genómico se obtuvo siguiendo las instrucciones para el protocolo de extracción de cultivos celulares del kit DNeasy® (Qiagen, Valencia, CA, USA). El ADN genómico de las muestras de contenido intestinal y heces obtenidas a partir de Junio del 2008 fue extraído con el kit DNAzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras de ADN utilizadas para la determinación del índice de infección con tripanosomas en mamíferos se obtuvieron a partir de sangre, siguiendo las especificaciones del protocolo de extracción de sangre del kit DNeasy®.

Para la determinación de linaje de *T. cruzi* (sección 4.7) y el análisis de microsatélites polimórficos (sección 4.8) se obtuvo ADN a partir de los medios de cultivo, siguiendo las instrucciones del protocolo para obtención de ADN de cultivo celular del kit DNeasy®. Todas las muestras de ADN obtenido fueron mantenidas a -20°C hasta su uso.

4.6. DETERMINACIÓN DE LOS ÍNDICES DE INFECCIÓN CON TRIPANOSOMÁTIDOS

4.6.1. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE DEL MINICÍRCULO DEL KINETOPLASTO

La amplificación del minicírculo del kinetoplasto (kADN) se realizó siguiendo el protocolo descrito en Vallejo *et al.*, 1999, utilizando los primers S35 (5'-AAA TAA TGT ACG GG(T/G) GAG ATG CAT GA-3') y S36 (5'-GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT-3'). La amplificación se realizó en un volumen total de 15 μ l que contiene 1X (7,5 μ l) HotStart Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) (1X tampón NH_4^+ , 1,5 mM MgCl_2 , 200 μ M de cada dNTP, 10 pM de cada primer, 1 unidad (0,2 μ l) de *Taq* polimerasa y 1 μ l de ADN). El proceso se llevó a cabo en un termociclador PT-100® (MJ Research, Waltham, MA, USA) con un paso inicial de 94°C por 15 minutos para la activación de la *Taq* polimerasa incluida en el kit, seguida de un paso de 94°C por 5 minutos, y 30 ciclos de amplificación de 94°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos, y 72°C por un minuto y medio. Adicionalmente 7 minutos de extensión final a 72°C. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% a 100 voltios en 1X de tampón de corrida TAE (0,04 M Tris, 1 mM EDTA), el cual fue teñido con bromuro de etidio en una concentración de 0,5 μ g/ μ l y visualizado bajo luz ultravioleta en el sistema de imágenes BioDoc-it™ (UVP, Upland, CA, USA).

4.6.2. CRITERIOS DE IDENTIFICACIÓN

El tamaño de los productos de PCR fue estimado en base a la comparación con marcadores de peso molecular de ADN (Promega). La identificación de la presencia de *T.*

cruzi y/o *T. rangeli* se realizó en base a una comparación con los productos de ADN de controles para ambas especies. La presencia de una banda de 330 pb determina la presencia de *T. cruzi*, mientras que la amplificación de una banda de 760 pb y una serie de bandas entre 300 pb y 450 pb determinan la presencia de *T. rangeli*.

4.7. CARACTERIZACIÓN DE LINAJES DE *Trypanosoma cruzi*

Para el proceso de caracterización se trabajó con el ADN obtenido de medios de cultivo. Se caracterizó un total de 138 muestras.

4.7.1. AMPLIFICACIÓN DEL DOMINIO D7 DEL GEN 24S α DE rRNA (rDNA), GEN *hsp60* y GEN *gpi*

Para la caracterización del gen 24S α se siguió el protocolo de Souto *et al.*, 1993, usando los primers D71 (5'-AAG GTG CGT CGA CAG TGT GG-3') y D72 (5'-TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT-3'). El gen *hsp60* fue amplificado siguiendo el protocolo de Sturm *et al.*, 2003 utilizando los primers *hsp60f* (5'-GTG GTA TGG GTG ACA TGT AC-3') y *hsp60r* (5'-CGA GCA GCA GAG CGA AAC AT-3'). Mientras que el gen *gpi* se amplificó según el protocolo de Gaunt *et al.*, 2003, usando los primers *gpifor* (5'-CGC ACA CTG GCC CTA TTA TT-3') y *gpirev* (TTC CAT TGC TTT CCA TGT CA-3').

La amplificación se realizó en un volumen final de 20 μ l que contiene 1X (2 μ l) de tampón NH $_4^+$ (Bioline Ltd., London, UK), 1,5 mM (24S α), 2 mM (*hsp60*), 4 mM (*gpi*) de MgCl $_2$, 200 μ M de cada dNTP, 20 pM de cada primer, 1 unidad (0,2 μ l) de *Taq* polimerasa (Bioline) y 1 μ l de ADN.

4.7.2. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador DNAengine® (Bio-Rad, UK) bajo las siguientes condiciones de amplificación:

24S α : Un paso de denaturación inicial de 94°C por tres minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación a 94°C por un minuto, 60°C por un minuto, 72°C por un minuto, adicionalmente un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos.

hsp60: Un paso de denaturación inicial de 94°C por dos minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por un minuto, adicionalmente un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos.

gpi: Un paso de denaturación inicial de 94°C por tres minutos, seguido de 28 ciclos de amplificación a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 3 minutos, adicionalmente un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos.

4.7.3. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

Los productos obtenidos en la amplificación de los genes *hsp60* y *gpi* fueron digeridos con las enzimas *EcoRV* (Promega) y *HhaI* (Promega), respectivamente, mediante incubación a 37°C por dos horas ó a temperatura ambiente toda la noche, siguiendo las instrucciones del proveedor.

4.7.4. VISUALIZACIÓN DE RESULTADOS

Los productos de amplificación del gen 24S α fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 3% a 70 voltios, mientras que los productos de la digestión de los amplificados de los genes *hsp60* y *gpi* fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% a 80 voltios. Todos los geles fueron corridos en 0,5X tampón TAE, teñido con 1X SYBR® Safe (Invitrogen) y visualizados bajo luz ultravioleta.

4.7.5. CRITERIOS DE IDENTIFICACIÓN

Genéticamente, el parásito *T. cruzi* ha sido subdividido en seis linajes (TcI a TcVI) y para su identificación se siguió el esquema recomendado por Lewis *et al.*, 2009 (Figura 5). El tamaño de los productos de PCR fue estimado en base a la comparación con bandas de peso conocido de escaleras de ADN (HyperLadder I, IV y V, Bioline).

4.8. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES

4.8.1. AMPLIFICACIÓN DE 10 LOCI POLIMÓRFICOS

Las 139 muestras que lograron ser caracterizadas a nivel de linaje fueron incluidas para el análisis de microsatélites. Únicamente las muestras para las cuales se pudieron obtener amplificados para 8 loci o más fueron incluidas. Un total de 126 muestras (81 de Loja, y 45 de Manabí) fueron seleccionadas. La amplificación se llevó a cabo en un volumen de reacción total de 20 μ l que contiene 1X (1 μ l) de tampón ThermoPol (New England Biolabs, UK), 4 mM MgCl₂, 200 μ M de dNTPs, 10 pM de cada primer marcado (Tabla 3), 1 unidad de *Taq* polimerasa (New England Biolabs) y aproximadamente 20 ng

de ADN. La amplificación se llevó a cabo con un proceso de denaturación inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 2 ciclos iniciales de amplificación a 94°C por 20 segundos, 57°C por 20 segundos y 72°C por 20 segundos. Posteriormente, se realizaron 26 ciclos de 94°C por 20 segundos, 54°C por 20 segundos y 72°C por 20 segundos. Adicionalmente, un paso de extensión final a 72°C por 20 minutos. Los loci que no amplificaron en un subset de muestras fueron amplificadas nuevamente usando mayor volumen de ADN.

4.8.2. DETERMINACIÓN DE ALELOS

El análisis de los fragmentos se realizó mediante el secuenciador AB3730 (Applied Biosystems, UK). Los productos de PCR marcados fueron cargados con una escalera con tamaños estándar G500 LIZ (Applied Biosystems). La determinación del tamaño de los alelos se realizó mediante el software GeneMapper (Applied Biosystems) en base a una comparación con la escalera estándar. La determinación de los alelos de cada muestra se realizó después de un chequeo manual para detectar errores, inconsistencias y el apareamiento de picos causados por artefactos. Este chequeo se realizó sin conocimiento previo del origen geográfico o del hospedero para evitar sesgos en la interpretación (Figura 6). Adicionalmente, se incluyó dentro del set una muestra determinada como *T. rangeli* para verificar que no exista reacción cruzada en los loci seleccionados.

4.8.3. EFECTO DE LA MULTICLONALIDAD

La multiclonalidad es un factor que se debe considerar cuando se está trabajando con muestras biológicas que no han pasado por un proceso de clonación. Este es el caso de los aislados de *T. cruzi* incluidos en este estudio. Este parásito es considerado diploide, sin embargo, debido a sus complejas interacciones con sus hospederos, es posible que una

misma muestra contenga más de una población diferente de *T. cruzi*, lo que fue evidente al detectar la presencia de muestras con tres ó más alelos. Debido a la influencia que puede tener la multiclonalidad en el análisis de la estructura genética de las poblaciones se utilizó un software (John Rivett-Carnac, Chorus Consulting Ltd.) que realiza varias combinaciones diploides en base al set de datos que contiene todos los alelos. Las bases de datos utilizadas para los cálculos se basaron en el cálculo de la media de las combinaciones realizadas.

4.8.4. AGRUPACIÓN DE POBLACIONES: F_{ST} y STRUCTURE

Para determinar las poblaciones definidas existentes dentro del set de datos analizado se utilizaron dos metodologías: el índice de F_{ST} y el software STRUCTURE. El F_{ST} es una medida de fijación que detecta la proporción de variación entre dos poblaciones causadas por una sub-división (Page y Holmes, 1998). Por lo que al comparar pares de poblaciones se puede determinar si entre ellas hay una distribución aleatoria de individuos o si se trata de sub-poblaciones separadas. Los valores de este índice varían entre 0 (distribución aleatoria) y +1 (separación en grupos, todos los grupos fijos para uno de los alelos disponibles). Altos niveles de flujo génico producen bajos valores de F_{ST} . (de Meeus *et al.*, 2006). Este valor fue calculado usando el software FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995) y la significancia estadística de la variación de los pares de alelos fue evaluada en ARLEQUIN v.3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Las comparaciones se realizaron en base al lugar de captura para las poblaciones de domicilio, peridomicilio y silvestre mediante 10 000 permutaciones aleatorias de alelos entre poblaciones.

Para corroborar la estructura poblacional determinada con F_{ST} , se utilizó el programa STRUCTURE 2.3.2 (Pritchard *et al.*, 2000) que infiere la presencia de distintas poblaciones asignando cada individuo a una población en base a sus genotipos y

frecuencias alélicas. Una de las debilidades de este programa, para su aplicación en organismos clonales, es que asume un equilibrio de ligamiento y un equilibrio de Hardy-Weimberg entre poblaciones, este aspecto fue considerado durante el análisis. En el caso de las muestras de Manabí, debido a la inestabilidad encontrada se realizó una modificación en el análisis de estas muestras. Se seleccionaron 10 sets de datos aleatoriamente, siguiendo el procedimiento señalado en 4.8.3 y cada una de estas bases de datos fue analizada con el software STRUCTURE, con el objetivo de evaluar la estabilidad de las muestras, es decir, comprobar si una misma muestra consistentemente pertenecía a la misma población en distintos análisis.

Las distancias genéticas D_{AS} (1-proporción de alelos compartidos en todos los loci / n) entre las muestras fueron comparadas en el software MICROSAT v0.12 (Minch *et al.*, 1995). La matriz final fue el resultado de obtener la media de 1 000 combinaciones (ver sección 4.8.3). Estos datos fueron la base para obtener el dendrograma usando el algoritmo de Neighbour-Joining (NJ).

Para determinar la relación entre los aislados ecuatorianos con otros aislados de diversas regiones de Latinoamérica, se emplearon datos de análisis con los mismos microsatélites para 72 aislados provenientes de Norte América, Venezuela, Bolivia, Argentina, Chile y Brasil, publicados previamente por Llewelyn *et al.*, (2009a). Debido a la influencia de la multiclonalidad en las muestras de la provincia de Manabí, este análisis se realizó únicamente con las muestras de Loja. En base a los alelos publicados se obtuvo una matriz de distancias genéticas D_{AS} que sirvió de base para el dendrograma usando el algoritmo de Neighbour-Joining (NJ).

4.8.5. DIVERSIDAD GENÉTICA

La diversidad genética fue analizada a nivel de poblaciones e incluyó el cálculo de la riqueza alélica (A_r), que mide la diversidad genética general en una población, y corrige la variación causada por el tamaño de muestra (Leberg, 2002), usando el programa FSTAT 2.9.3.2 y el número de alelos únicos en cada población (alelos exclusivos, AE) (Kalinowski, 2004).

4.8.6. ÍNDICE DE HETEROCIGOCIDAD

Los datos de heterocigocidad observada y esperada fueron calculados en ARLEQUIN v.3.1. Las muestras que se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg demuestran que son una población en panmixia (apareamiento aleatorio entre individuos), mientras que una población que no está en equilibrio Hardy-Weinberg muestra exceso o déficit de heterocigocidad (Page y Holmes, 1998). Adicionalmente, cada loci fue evaluado individualmente para determinar su nivel de desviación con las proporciones de Hardy-Weinberg y su significación estadística (p) fue determinada después de la corrección de Bonferroni, para limitar la posibilidad de cometer un error tipo I y rechazar la hipótesis nula, siendo correcta, que en este caso se trata de la hipótesis que apoya la panmixia.

4.8.7. ÍNDICE DE ENDOGAMIA

Este valor fue calculado mediante el índice de F_{IS} , para cada locus, con el software FSTAT 2.9.3.2. Luego se realizó el cálculo de la media y error estándar para todos los loci. Este parámetro evalúa el nivel de endogamia entre los individuos que puede producir una desviación de la panmixia como resultado de un apareamiento no aleatorio. Estos valores

varían entre -1 (todos los loci son heterocigotos), 0 (hay equilibrio Hardy-Weinberg y los alelos están distribuidos aleatoriamente), +1 (todos los loci son homocigotos) (de Meeus *et al.*, 2006).

4.8.8. ÍNDICE DE ASOCIACIÓN

El índice de asociación (I_A) evalúa la probabilidad de asociación en una población mediante la cuantificación de recombinación y la detección de asociación entre alelos en diferentes loci (Maynard-Smith *et al.*, 1993). Es decir, un valor de I_A igual a 0, sugiere frecuentes eventos de recombinación. La significación estadística de la desviación de 0 fue evaluada con el software MULTILOCUS v.1.3 (Agapow y Burt, 2001).

4.8.9. AISLAMIENTO POR DISTANCIA

La relación entre distancia genética y distancia geográfica se obtuvo mediante una prueba de Mantel que evalúa la correlación entre las dos matrices (distancia genética (D_{AS}) vs. distancia geográfica en km). La significación estadística fue evaluada en GENALEX v.6 (Peakall y Smouse, 2006).

Este análisis fue realizado únicamente con las muestras de la provincia de Loja, debido a que el muestreo en esta provincia abarca una gran extensión geográfica, mientras que las muestras de la provincia de Manabí están restringidas a un área geográfica pequeña.

5. RESULTADOS

5.1. ÍNDICES DE INFECCIÓN CON TRIPANOSOMÁTIDOS

5.1.1. ÍNDICE DE INFECCIÓN EN TRIATOMINOS

Se analizó un total de 1 274 triatominos de cinco especies (*R. ecuadoriensis*, *T. carrioni*, *P. chinai*, *P. rufotuberculatus* y *P. howardi*) (Tabla 4). *R. ecuadoriensis* fue la especie con mayor número de individuos colectados ($n = 785$) y la única especie colectada tanto en Loja como en Manabí. En cuanto a la distribución geográfica de triatominos infectados con tripanosomátidos, en la provincia de Manabí ($n = 198$) se detectó la presencia de *T. cruzi* en nueve comunidades, mientras que *T. rangeli* estuvo presente en siete de 11 comunidades muestreadas (Figura 7), siendo *R. ecuadoriensis* la especie encontrada en mayor cantidad ($n = 150$) (Tabla 4). En la provincia de Loja ($n = 1 076$), se encontró la presencia de *T. cruzi* en todos los cantones muestreados en un total de 26 de 44 comunidades. Mientras tanto *T. rangeli* fue detectado en apenas 10 comunidades pertenecientes a seis cantones (Figura 8).

En cuanto a índices de infección con *T. cruzi*, se reporta una infección general de 28% (entre infecciones exclusivamente con *T. cruzi* e infecciones mixtas con *T. rangeli*). En la provincia de Manabí, tanto el peridomicilio como el ambiente silvestre muestran altos índices de infección de ($\geq 40\%$), mientras que en Loja, son los hábitats silvestre y domiciliar los que presentan los índices más altos (67,8% y 12% respectivamente). En el análisis de la presencia de *T. cruzi* por especie de vector, este parásito fue detectado en todas las especies, excepto en *P. rufotuberculatus*. En Manabí, la especie con mayor índice

de infección es *P. howardi* (53,2%), mientras que el Loja, es *R. ecuadoriensis* con 32% (Tabla 4).

La presencia de *T. rangeli*, ya sea en infección única o mixta con *T. cruzi*, fue confirmada en ambas provincias (7,6%) en cuatro de las cinco especies de vectores colectadas (*R. ecuadoriensis*, *T. carrioni*, *P. chinai* y *P. howardi*). Al igual que en la infección con *T. cruzi*, la presencia de *T. rangeli* no pudo ser evidenciada en *P. rufotuberculatus*. Tanto en Manabí como en Loja, los índices de infección más altos se encuentran en el hábitat silvestre (25,7% y 16,6%, respectivamente), siendo *R. ecuadoriensis* el vector con mayor infección con *T. rangeli*, 8,3% en Loja y 22% en Manabí (Tabla 4).

El índice general de infecciones mixtas con *T. cruzi* y *T. rangeli* es de 2,8%, siendo Manabí y el hábitat silvestre el que presenta la mayor tasa de infección (4% y 11,4% respectivamente) (Tabla 4).

5.1.2. ÍNDICE DE INFECCIÓN EN MAMÍFEROS

Se analizaron 520 individuos pertenecientes a tres ordenes (Rodentia, Didelphiomorpha y Chiroptera). Veinte especies fueron identificadas, mientras que algunos individuos sólo pudieron ser identificados hasta el nivel de género o familia debido a que se trataba de juveniles (Tabla 5). En la provincia de Manabí, se encontró únicamente la presencia de *T. cruzi* circulando en los mamíferos colectados en las 4 comunidades (Figura 7). Mientras, que en la provincia de Loja se detectó la presencia de ambas especies; *T. cruzi* en 14 comunidades, y *T. rangeli* en 3 comunidades de un total de

19 muestreadas. En los cantones Espíndola (n = 29) y Sozoranga (n = 7) no se encontraron evidencias de tripanosomátidos circulando en mamíferos (Figura 8).

El índice general de infección con *T. cruzi* en mamíferos fue de 17,5%, incluyendo las muestras con infección mixta con *T. rangeli*. En la provincia Manabí, se detectó un alto índice de infección en peridomicilio (40,8%) y, al igual de lo observado en los triatominos, no se observó infección en los mamíferos capturados en el domicilio, sin embargo, el ambiente silvestre presenta un índice de infección bajo (2,8%). En cambio, en la provincia de Loja, el índice de infección más alto se observa en el ambiente silvestre (> 20%), mientras que en los ambientes domiciliar y peridomiciliar este índice es similar entre ambos hábitats (> 12%) (Tabla 5). En cuanto a la presencia de *T. cruzi* en distintos tipos de reservorios, se detectó un alto índice de infección (54,1%) en los marsupiales de Manabí, mientras que los roedores presentaron apenas un 1,5% de infección en esta provincia. En Loja se observa una infección mayor en murciélagos (30%), seguido de marsupiales (19,7%) y roedores (14,1%) (Tabla 5).

La prevalencia de *T. rangeli* en mamíferos es baja y este parásito estuvo presente en apenas un 0,6% de las infecciones (incluyendo las infecciones mixtas con *T. cruzi*). La presencia de *T. rangeli* no fue detectada en las muestras de mamíferos en Manabí en ninguno de los hábitats de colección (domicilio, peridomicilio y silvestre), mientras que entre los mamíferos colectados en Loja, *T. rangeli* estuvo presente únicamente al ambiente silvestre (Tabla 5).

Las Figuras 9 y 10 presentan gels con muestras representativas de las principales especies de triatominos y mamíferos capturados en hábitat domiciliar, peridomiciliar y silvestre y los pesos moleculares de los amplicones obtenidos con los primers S35 y S36 para la detección de *T. cruzi* y *T. rangeli*.

5.2. CARACTERIZACIÓN DE LINAJES DE *T. cruzi*

Un total de 138 aislados fueron caracterizados como pertenecientes al linaje *T. cruzi* I (TcI). Este linaje estuvo presente independientemente de lorigen geográfico y del hospedero (reservorio ó vector) del que provenían los aislados. Un resumen de los resultados obtenidos con los marcadores *gpi*, *hsp60* y 24S α de rARN se encuentra en la Tabla 6.

Asimismo, pueden observarse figuras de los análisis moleculares de muestras representativas de los diferentes hospederos (mamíferos y vectores) y diferentes hábitats de captura (domicilio, peridomicilio y silvestre) para los genes rARN de 24S α (Figura 11, 12), *hsp60* (Figura 13–17) y *gpi* (Figura 18–22).

5.3. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES

Este análisis busca delinear la estructura genética de las poblaciones aisladas de *T. cruzi* para definir su dinámica dentro de los ciclos de transmisión. La estrategia utilizada fue diferente para las muestras de Manabí que las de Loja.

Los resultados obtenidos de las muestras de Manabí constituyeron un análisis preliminar, dadas las limitaciones en el número y la cobertura geográfica de las mismas. Este set de muestras piloto reveló un exceso de multiclonalidad que causa una alta inestabilidad de las muestras. Debido a esto, no fue posible realizar el cálculo de parámetros que se obtienen en base a datos diploides (Ej. heterocigocidad). No obstante se realizó un análisis preliminar general para establecer las posibles tendencias de estas

poblaciones y un estudio que incluye incremento de muestras y rango geográfico se está llevando a cabo.

Las muestras de Loja, en cambio, constituyeron un set de datos completos y son representativos de la variabilidad existente a nivel provincial, lo que permitió realizar inferencias sobre su dinámica. Estas muestras pudieron ser analizadas en detalle para determinar tanto su estructura poblacional como las características genéticas de sus subpoblaciones (variabilidad genética, heterocigocidad, índices de endogamia, asociación y efecto del aislamiento por distancia).

Dadas las diferentes características entre ambos sets de datos (Manabí y Loja), únicamente se realizó un análisis general de los aislados, en conjunto, para conocer la tendencia de su estructura poblacional. Estos resultados junto con los obtenidos para cada provincia se detallan a continuación.

5.3.1. AGRUPAMIENTO DE POBLACIONES ECUATORIANAS

Se realizó el análisis de microsatélites para 126 muestras (81 muestras de la provincia de Loja y 45 muestras de Manabí) (Tabla 7 y 8). Se obtuvo un set de datos con 2547 alelos en los 10 loci analizados, excluyendo los datos perdidos, que son aquellos loci de los que no se obtuvo producto para el análisis (Tabla 9 y 10).

Según la matriz de distancias genéticas (D_{AS}) las muestras ecuatorianas no presentan una clara agrupación de poblaciones definida por región geográfica u hospedero, sin embargo se observa cierta tendencia relacionada con el hábitat de captura. Se distinguen tres poblaciones: 1) una conformada principalmente por los aislados colectados

en domicilio y peridomicilio de Loja, 2) otra en la que se agrupan las muestras de peridomicilio de Manabí, y 3) en la que se agrupan, principalmente, las muestras selváticas de Loja y Manabí (Figura 23). Esta tendencia de estructura poblacional se ve reforzada por los valores de F_{ST} obtenidos al comparar estas poblaciones, en la que se evidenció diferencias altamente significativas entre la población 1 y 2 ($F_{ST} = 0,271$; $p = 0,000$), 2 y 3 ($F_{ST} = 0,370$; $p = 0,000$), y 1 y 3 ($F_{ST} = 0,374$; $p = 0,000$). Sin embargo, una estructura poblacional diferente fue obtenida mediante el análisis en el programa STRUCTURE en la cual no existe una clara definición de las poblaciones. Además, la fortaleza de la rama principal del árbol obtenido no es grande (4,7%) y esto se confirma al medir la estabilidad del dendrograma, en el que se observa apenas un 7,7% de congruencia. Estos resultados no permiten determinar en forma clara la estructura poblacional a partir de este set de muestras. Sin embargo, se observa una tendencia de las muestras peridomiciliares provenientes de Manabí, de formar un grupo diferente al de las muestras silvestres tanto de Manabí como de Loja. En el caso de las muestras de Loja, se observa una clara separación entre las muestras colectadas en el domicilio y peridomicilio de las muestras colectadas en el hábitat silvestre.

5.3.2. ANÁLISIS DE AISLADOS DE LA PROVINCIA DE MANABÍ

Se analizaron 45 aislados de triatomíneos y mamíferos de dos hábitats (peridomicilio y silvestre) en nueve comunidades de la provincia de Manabí. Durante las búsquedas activas no se encontraron triatomíneos ni tampoco mamíferos infectados con *T. cruzi* en el hábitat de domicilio, por lo que no fue posible incluir este hábitat en el análisis. Se analizó un set de 910 alelos, sin incluir los datos perdidos (Tabla 9).

5.3.2.1. AGRUPACIÓN DE POBLACIONES DE MANABÍ Y EL EFECTO DE LA MULTICLONALIDAD

El dendrograma obtenido a partir del análisis de las distancias genéticas D_{AS} muestra la agrupación de dos poblaciones: $MANABI_{Peri}$, formada únicamente por aislados colectados en el hábitat de peridomicilio, y $MANABI_{Silv}$ formada principalmente, pero no exclusivamente, por aislados colectados en el hábitat silvestre (Figura 24). Esta estructura de aislados tiene el soporte de los valores de F_{ST} que muestra diferencias altamente significativas entre ambas poblaciones ($F_{ST} = 0,32722$, $p = 0,000$). Sin embargo, el alto porcentaje de multiclonalidad encontrado en las muestras colectadas en el peridomicilio (46,8%) y el muestreo no equilibrado (36 muestras de peridomicilio vs. 9 muestras selváticas), ponen en cuestionamiento la estabilidad de esta división. Para determinar si la multiclonalidad afecta la separación de estas poblaciones, se generó un árbol consenso con 1 000 combinaciones de bases de datos (tomando en cuenta todos los alelos generados por las muestras multiclonales), en todos estos árboles se se mantiene la división de las poblaciones $MANABI_{Peri}$ y $MANABI_{Silv}$, lo que indica que a pesar de la multiclonalidad, se mantiene esta tendencia de división. A pesar de estos resultados, la inestabilidad se vio reflejada al tratar de establecer la estructura poblacional (número de poblaciones = K) mediante el programa STRUCTURE. Para determinar si la inestabilidad era causada por las muestras se analizaron 10 bases de datos aleatorias. El programa clasificó a las muestras entre $K = 4$ y $K = 7$, lo que muestra una diferencia importante de número de poblaciones definidas en cada base de datos. La concordancia en la asignación individual de cada muestra a las distintas poblaciones fue evaluada dentro de cada base de datos, así como entre las diferentes bases de datos, mostrando una gran variabilidad entre repeticiones. Por lo tanto los resultados del software STRUCTURE, no corroboran la división de los aislados de Manabí en dos poblaciones ($MANABI_{Peri}$ y $MANABI_{Silv}$). Sin

embargo, los datos de las distancias genéticas (D_{AS}) y F_{ST} indican una tendencia de divergencia de las poblaciones de *T. cruzi* relacionada con el ciclo de transmisión (peridomiciliar y selvático).

También es importante mencionar que, en el dendrograma de distancias genéticas obtenido, algunas muestras colectadas en el hábitat peridoméstico fueron asignadas a la población silvestre ($MANABIS_{Silv}$), lo que sugiere que existe flujo genético (i.e. dispersión de parásitos) entre hábitats, aunque en forma limitada (ver Figura 24 muestras 33-35 y 38). Sin embargo, se debe incrementar el número de muestras silvestres para confirmar esta tendencia.

5.3.3. ANÁLISIS DE AISLADOS DE LA PROVINCIA DE LOJA

Se analizaron 81 muestras aisladas de triatomíneos y mamíferos de los hábitats domicilio, peridomicilio y silvestre en 26 comunidades de la provincia de Loja. Se analizó un set de 1637 alelos, sin incluir los datos perdidos (Tabla 7). Dentro de este grupo de datos, las muestras con más de tres alelos están presentes en el 3,1% de los loci.

5.3.3.1. AGRUPACIÓN DE POBLACIONES DE LOJA Y EL EFECTO DE LA MULTICLONALIDAD

El dendrograma de neighbor-joining obtenido a partir de las distancias genéticas D_{AS} mostraron la división de dos poblaciones: $LOJA_{Dom/Peri}$ formado principalmente por los aislados colectados en los hábitats de domicilio y peridomicilio y $LOJA_{Silv}$ compuesto por los aislados colectados en el hábitat silvestre (Figura 25). La rama que separa estas dos poblaciones tiene una fortaleza del 56,5%. Este valor bajo podría haber sido causado por la

multiclonalidad de las muestras. No obstante, para determinar el efecto de la multiclonalidad en esta separación de poblaciones y medir la congruencia de la rama, se realizó 1 000 combinaciones diploides, considerando todos los alelos y se obtuvo una congruencia de 100%, lo que confirmó la presencia de dos poblaciones dentro de las muestras de Loja. Además, ésta estructura poblacional fue corroborada mediante el programa STRUCTURE (Tabla 8). Adicionalmente, se calculó el valor de F_{ST} entre las muestras agrupadas por su hábitat de captura. No se detectaron diferencias significativas entre los aislados provenientes del domicilio y peridomicilio ($F_{ST} = 0,027$, $p = 0,354$), formando ambas una sola población; en cambio, las muestras provenientes del hábitat silvestre mostraron diferencias altamente significativas ($F_{ST} = 0,212$, $p = 0,000$) cuando fueron comparadas con los aislados de domicilio y peridomicilio (de forma agrupada).

Al analizar la distribución de las muestras en base al lugar de captura (color de las ramas del dendrograma, Figura 25) es evidente la presencia de aislados colectados en el hábitat silvestre que forman parte del grupo $LOJA_{Dom/Peri}$ y vice-versa (Figura 25, ejm: muestras 6, 8, 11, 16, 17, 18, 57, 58 y 68). Este hecho podría evidenciar flujo, aunque muy limitado, de parásitos entre los ciclos de transmisión domiciliar, peridomiciliar y silvestre. Esta tendencia se hace visible cuando se analiza la proporción de muestras de un genotipo dado ($LOJA_{Dom/Peri}$ o $LOJA_{Silv}$) capturados en un hábitat que no corresponde a su genotipo (domicilio/peridomicilio (D/P) o silvestre (S)) (Figura 26).

5.3.3.2. DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE LOJA

El índice de riqueza alélica (A_r) mostró una considerable diversidad genética, aunque no evidenció una gran variación entre las poblaciones de $LOJA_{Dom/Peri}$ ($3,851 \pm 0,527$) y $LOJA_{Silv}$ ($4,583 \pm 0,504$). Es decir, ambas poblaciones mostraron una alta

diversidad. En lo que se refiere al número de alelos exclusivos, se observó un mayor número en la población silvestre, que además fue la más grande (en número de muestras) y la que presentó una diversidad mayor ($AE = 2,0$) en relación a la población de domicilio/peridomicilio que presentó carencia de alelos exclusivos ($AE = 0,8$) (Tabla. 11).

5.3.3.3. ÍNDICE DE HETEROCIGOCIDAD DE LOS AISLADOS DE LOJA

La población $LOJA_{Dom/Peri}$ está en equilibrio Hardy-Weinberg, dado que muestra el mismo valor de heterocigocidad observada que la esperada ($H_O = 0,478$, $H_E = 0,478$) (Tabla 11). Es decir, el nivel de flujo genético en esta población es equivalente al de una población con reproducción sexual. Además, tomando en cuenta que las poblaciones de reproducción sexual no presentan un déficit o exceso de heterocigocidad (porque están en equilibrio), el haber obtenido un 0% en la proporción de déficit (%PL H_D) y exceso de heterocigocidad (%PL H_E) (Tabla 11) apoyan la evidencia de sexualidad en la población $LOJA_{Dom/Peri}$.

En el caso de la población $LOJA_{Silv}$, los datos de heterocigocidad muestran características de una población clonal, debido a que se observa una desviación del equilibrio Hardy-Weinberg ($H_O = 0,367$, $H_E = 0,478$). Además, los datos obtenidos indican un alto porcentaje de muestras (44,3%) que presentan déficit de heterocigocidad (%PL H_D) (Tabla 11).

5.3.3.4. ÍNDICE DE ENDOGAMIA EN AISLADOS DE LOJA

El índice de endogamia (F_{IS}) de la población $LOJA_{Dom/Peri}$ muestra valores cercanos a 0 ($0,003 \pm 0,084$) que complementa los resultados obtenidos en el análisis de heterocigocidad y sugieren que la reproducción sexual, en esta población, es más frecuente de lo esperado. A diferencia de lo calculado para la población $LOJA_{Silv}$, en la que el valor de F_{IS} se aleja de 0 ($0,184 \pm 0,098$) confirmando la tendencia clonal de la población selvática (Tabla 11).

5.3.3.5. ÍNDICE DE ASOCIACIÓN DE LAS POBLACIONES DE LOJA

En la población de $LOJA_{Dom/Peri}$ los valores de asociación corroboran la evidencia de sexualidad ya que no se detectó una asociación significativa dentro de esta población ($I_A = 0,227$, $p = 0,063$) (Tabla 11). Mientras que, en la población $LOJA_{Silv}$ el índice de asociación es altamente significativo ($I_A = 0,597$, $p < 0,001$), lo que es un indicativo de reproducción clonal (Tabla 11).

5.3.3.6. EFECTO DEL AISLAMIENTO POR DISTANCIA EN LOS AISLADOS DE LOJA

La prueba de Mantel para determinar la correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética mostró un comportamiento diferente entre los individuos tanto de la población $LOJA_{Dom/Peri}$ como de la población $LOJA_{Silv}$.

Basados en los resultados de correlación, no se encontró una estructura espacial entre los individuos de la población $LOJA_{Dom-Peri}$ ($D_{AS} - R_{XY} = 0,100$, $p = 0,164$; $\delta\mu^2 - R_{XY}$

= -0,05, $p = 0,384$), lo que sugiere que existe una rápida dispersión de parásitos entre los hábitat de domicilio y peridomicilio a lo largo de todo el rango geográfico estudiado (Figura 27). Por otro lado, la población $LOJA_{Silv}$ mostró evidencia de una fuerte estructura espacial relacionada con la distancia ($D_{AS} - R_{XY} = 0,265$, $p = 0,000$; $\delta\mu^2 - R_{XY} = 0,177$, $p = 0,001$), causando aislamiento entre los parásitos de regiones lejanas por la distancia que existe entre ellos (Figura 27).

6. DISCUSIÓN

La Enfermedad de Chagas es aún uno de los problemas más graves de salud pública en América Latina, a pesar de que uno de los objetivos de la Organización Mundial de la Salud, mediante las iniciativas de control y prevención, era el de interrumpir la transmisión de esta enfermedad para el 2010 (OPS/OMS, 2004). Si bien la transmisión ha sido controlada en varios países, en especial del cono sur de América del Sur, en el norte de ésta región y en Centroamérica no se ha tenido el éxito esperado. Las razones van desde el ámbito biológico, por la extrema complejidad epidemiológica, hasta la inestabilidad política en la región. A pesar de eso, grandes avances han sido realizados y la implementación de programas de control y el tamizaje de sangre de donantes han sido logros significativos.

En Ecuador, las estimaciones oficiales de prevalencia representan, probablemente, menos del 20% de la cifra real (Abad-Franch y Aguilar, 2003). Ésta subestimación es parcialmente responsable de la falta de un programa de control bien planificado. Sin embargo, durante los últimos años, la situación epidemiológica de esta enfermedad está siendo delineada mediante investigaciones sistemáticas en varias provincias endémicas para la ECh. Actualmente, hay un mayor conocimiento de la distribución y hábitats de infestación de las diferentes especies de vectores (Grijalva *et al.*, 2005a; Grijalva y Villacís, 2009; Suarez-Davalos *et al.*, 2010), así como de mamíferos reservorios (Pinto *et al.*, 2006), la seroprevalencia en zonas endémicas (Grijalva *et al.*, 2003; Black *et al.*, 2007; 2009) y no endémicas (Grijalva *et al.*, 2005b). Esta información ha permitido tener un conocimiento base sobre la situación epidemiológica en el país.

En Ecuador, el control de la ECh está regulado por el Programa Nacional de Chagas y sus esfuerzos se han enfocado en el control de las poblaciones de triatomíneos para reducir la transmisión vectorial. Sin embargo, las medidas de control no pueden ser basadas únicamente en el control de las poblaciones de vectores y es necesario comprender la complejidad de las interacciones hospedero-vector-parásito. Este estudio busca definir la genética de las poblaciones de *T. cruzi* en el Ecuador, la presencia del parásito en vectores, hospederos y sus diferentes hábitats, así como la interacción entre ellos. La dinámica de la transmisión y las características específicas de estas interacciones en dos zonas endémicas para la ECh (Manabí y Loja) fueron estudiadas en base al uso de marcadores moleculares de alta resolución. Los resultados obtenidos serán discutidos en base a su impacto en la epidemiología local de la ECh en cada provincia y en el análisis se considerará las características específicas de cada región.

6.1. INFECCIÓN DE TRIPANOSOMÁTIDOS EN TRIATOMINOS

6.1.1. INFECCIÓN CON *Trypanosoma cruzi*

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la presencia de las dos principales especies de tripanosomátidos que circulan en América, *T. cruzi* y *T. rangeli*, en poblaciones de vectores de Loja y Manabí y sustenta lo reportado en estudios previos (Grijalva y Villacís, 2009; Suarez-Davalos *et al.*, 2010). La presencia de *T. cruzi* (28%) es mayor que la de *T. rangeli* (7,6%) independientemente de la especie de vector, estadio de desarrollo o del hábitat de colección.

La única especie de vector que se encontró en ambas provincias y en todos los hábitats fue *R. ecuadoriensis*, considerado el segundo vector de importancia

epidemiológica en Ecuador (Abad-Frach *et al.*, 2001). Paradójicamente, y a pesar de los esfuerzos realizados, no se encontraron individuos de la especie *T. dimidiata* considerado como el principal vector en el país y reportado con una amplia distribución en Ecuador (Abad-Frach *et al.*, 2001). Otro aspecto importante de *R. ecuadoriensis* es que fue la especie de vector más abundante que se encontró en el hábitat silvestre en Manabí; mientras que en Loja, *R. ecuadoriensis* fue la única especie silvestre y presentó altas densidades poblacionales. Además de su amplia distribución geográfica y su capacidad de invadir todos los hábitats (domicilio, peridomicilio y silvestre), ésta especie presenta los índices de infección con *T. cruzi* más altos (> 30%), independientemente del hábitat de colección. La presencia de este vector en ambientes silvestres pone en evidencia su importancia como fuente para la re-infestación de triatominos en ambientes domiciliar y peridomiciliar. Suarez-Davalos *et al.*, 2010, analizaron el riesgo de re-infestación, en áreas donde se habían tomado medidas químicas de control vectorial, y se encontró que las poblaciones de vectores silvestres tienden a agregarse a < 100 m de las viviendas. El único hábitat en el que se encontró un índice de infección bajo (9,9%), para *R. ecuadoriensis*, es en el peridomicilio en la provincia de Loja. Esto podría deberse a que parte de los individuos fueron colectados en nidos de gallinas, y las aves son refractorias a la infección ya que la alta temperatura corporal junto con el sistema del complemento de las aves presenta una actividad lítica sobre los parásitos, eliminando la infección (Kierszenbaum *et al.*, 1981; Minter-Goedbloed y Croon 1981). Los resultados de este estudio junto con la comprobada eficiencia vectorial de *R. ecuadoriensis* (Villacís *et al.*, 2008) implicarían a esta especie como el principal vector para la transmisión de la ECh en Ecuador. En la provincia de Manabí, no se encontró infestación con triatominos en el domicilio, sin embargo se reporta la presencia de *P. howardi* en el hábitat de peridomicilio. Muy poco se conoce sobre la biología de este vector y hay reportes de pocos individuos en poblaciones selváticas (Suarez-Davalos *et al.*, 2010). Esta especie, junto con *R. ecuadoriensis*, es de

particular interés en el control de la transmisión de la ECh en Manabí. Pobladores de varias comunidades visitadas han reportado la presencia de adultos de estos vectores que ingresan a las viviendas atraídos por la luz (Grijalva, datos no publicados). Teniendo en cuenta la alta densidad poblacional de individuos de esta especie de vectores en el peridomicilio, su cercano contacto con mamíferos sinantrópicos (ratas, raposas) y su elevado índice de infección con *T. cruzi* (53,2%), es probable que individuos de *P. howardi* infectados con *T. cruzi* estén en contacto con humanos con frecuencia.

En términos de control vectorial en la provincia de Manabí, la ausencia de vectores en el intradomicilio y las características del peridomicilio, como abundante vegetación y cercas vivas (en donde hay gran variedad de nidos de aves y mamíferos) hacen que las clásicas estrategias de control (rociado de domicilio y peridomicilio) no sean eficientes (Grijalva, datos no publicados) y se deba buscar estrategias alternativas. Sin embargo, mientras no se conozca la biología de los vectores y del parásito, no se podrá evaluar si estas estrategias son efectivas.

En la provincia de Loja, se confirmó la presencia de los vectores *T. carroni* y *P. chinai* restringidos al sur del país (Abad-Franch *et al.*, 2001). *T. carroni* es la especie que presenta el menor índice de infestación con *T. cruzi* (6%) y se encuentra restringida a los hábitat de domicilio y peridomicilio como se había reportado previamente (Abad-Franch *et al.*, 2001; Grijalva *et al.*, 2005). *P. chinai*, en cambio, presenta un mayor índice de infección con *T. cruzi* (11,9%) y fue encontrado colonizando los hábitat de domicilio y peridomicilio (por la presencia de ninfas). Si bien la presencia adultos de esta especie en estos hábitat ya ha sido reportado (Grijalva *et al.*, 2005), ésta es una especie considerada como transmisora del parásito en hábitats silvestres (Abad-Franch *et al.*, 2001; Cuba-Cuba *et al.*, 2002). Sin embargo, y a pesar de la extensa búsqueda en la zona selvática, no se

encontraron poblaciones silvestres de *P. chinai*. Los resultados de infestación, junto con los datos de infección con *T. cruzi* implican a *T. carrioni* y *P. chinai* en la transmisión vectorial a humanos en la parte sur del Ecuador. Además, al ser especies domiciliadas podrían ser controladas mediante la aplicación sistemática de rociamiento y vigilancia epidemiológica.

P. rufotuberculatus se encontró restringido al hábitat domiciliar en la provincia de Loja, y es la única especie de vector en la que no se detectó la presencia de tripanosomátidos. El número de individuos colectados y analizados es bajo, no obstante no se descarta la infección con *T. cruzi* ya que su infección natural ha sido previamente reportada (Calderon-Arguedas *et al.*, 2004; Traviezo-Valles *et al.*, 2008). Además, a pesar de ser considerada una especie restringida al domicilio (Abad-Franch *et al.*, 2001) no se descarta su presencia en ambientes silvestres, al menos en Manabí, en donde se encontró un individuo de *P. rufotuberculatus* en nido de rata y se continúan haciendo reportes similares (Grijalva, datos no publicados). Por lo que es importante realizar un seguimiento continuo al estado de las poblaciones de esta especie.

6.1.2. INFECCIÓN CON *T. rangeli*

T. rangeli, a pesar de encontrarse en menor proporción (7,6%) que *T. cruzi* (28%), fue encontrado en cuatro de las cinco especies de vectores colectadas (*R. ecuadoriensis*, *P. howardi*, *P. chinai*, *T. carrioni*). Sin embargo, el número de individuos de *P. rufotuberculatus* analizados fue bajo y, al igual que con *T. cruzi*, no se descarta la presencia de *T. rangeli* infectando esta especie de vector.

Si bien *T. rangeli* no es patógeno para el ser humano, su importancia médica y epidemiológica se basa en la cercana relación filogenética y el hecho de compartir reservorios, vectores y área geográfica con *T. cruzi*, lo que podría influir en los datos epidemiológicos y diagnóstico de la ECh debido a similitud morfológica y reactividad cruzada con *T. cruzi* en pruebas diagnósticas. En este estudio se encontró la presencia de *T. rangeli* circulando en los tres hábitats de colección (domicilio, peridomicilio y silvestre). El alto porcentaje de infección en el ambiente silvestre (> 15%) en ambas provincias confirma que esta especie de parásito se encuentra circulando activamente en su ciclo silvestre y que puede ser una fuente importante de *T. rangeli* para hábitats domiciliarios y peridomiciliarios. En cuanto a la presencia de *T. rangeli* en el hábitat de domicilio y peridomicilio, podemos ver que la situación en Manabí y Loja es muy diferente. En la primera, el índice de infección es alta (17,2%), mientras que en Loja es de apenas el 2,2%. Esto sugiere la posibilidad de un error en el diagnóstico de la ECh por la presencia de *T. rangeli* circulando en estas áreas. En los casos de ECh crónicos, la detección se realiza mediante exámenes serológicos, y actualmente en el país se ha reportado el uso de siete kits para detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* (Grijalva *et al.*, 2009). Si bien no hay un estudio que compare la especificidad de estas pruebas serológicas con muestras ecuatorianas, un estudio previo evaluó tres de los kits de diagnóstico usados en Ecuador, con pacientes provenientes de Brasil, Panamá y Venezuela, y no mostraron reacciones cruzadas con *Leishmania spp.* ni *T. rangeli* (Caballero *et al.*, 2007). A pesar de que en estas zonas no se excluye la posibilidad de exposición a *T. rangeli*, los autores sugieren que este parásito no induce la suficiente producción de anticuerpos como para causar una reacción cruzada que interfiera en el diagnóstico serológico de la ECh (Caballero *et al.*, 2007). Por otro lado, en el caso de la detección de pacientes en etapa aguda, el diagnóstico se realiza mediante la detección de parásitos en la sangre. En estos casos la presencia de *T. rangeli* podría ser un factor de error en el diagnóstico, porque si bien es posible la

diferenciación morfológica entre ambas especies (Urdaneta-Morales y Tejero, 1992), esta requiere de personal capacitado. Para afrontar este hecho, durante los últimos dos años, el Programa Nacional de Chagas de Ecuador ha realizado capacitaciones al personal de campo y microscopistas que detectan *Plasmodium*, causante de la malaria, en placas de gota gruesa para que también se detecte la presencia de *T. cruzi*. Sin embargo, estrategias políticas para la sostenibilidad a largo plazo de estas acciones aún deben ser definidas.

Otro punto interesante de discusión es el posible efecto de *T. rangeli* en la población de vectores. Se ha reportado que *T. cruzi* no es patogénico para el vector, sin embargo, se ha visto fuertes efectos patogénicos causados por *T. rangeli* en vectores del género *Rhodnius* y *Triatoma*, especialmente en cuanto al número de simbioses en el intestino del vector (Eicher y Schaub, 2002; Vallejo *et al.*, 2009). En este estudio se encontró un índice bajo de infección general con *T. rangeli* en Loja (5,6%) y no se encontró ninguna tendencia clara en relación con la estructura poblacional de vectores (38 ninfas, 22 adultos). Sin embargo en Manabí, se observó otra tendencia, que si bien requiere estudios específicos y un mayor número de muestras, será discutida brevemente en esta sección. Los vectores analizados en Manabí presentan un alto índice de infección con *T. rangeli* (14,6%) y hay una mayor cantidad de ninfas infectadas que adultos (28 y 9 respectivamente), en este caso este índice podría estar relacionados con la estructura poblacional del vector, es decir, el encontrar mayor infección con *T. rangeli* en ninfas que en adultos podría sugerir que *T. rangeli* puede tener un rol en la capacidad de los vectores para llegar a la etapa adulta. Si bien todos los estadios de los vectores son susceptibles a la infección y transmisión de *T. cruzi*, fisiológicamente para que un vector pase de un estadio a otro requiere alimentarse con sangre (Guarneri *et al.*, 2000; Villacís *et al.*, 2008) y, el reducir el número de vectores que alcanzan el estadio adulto significaría reducir el número de picaduras potencialmente infectivas. Sin embargo, si bien los datos sugieren esta

influencia de *T. rangeli* sobre las poblaciones de vectores, es necesario realizar estudios específicos que determinen el efecto patogénico de *T. rangeli* en los diferentes estadios de los triatominos.

6.2. INFECCIÓN DE TRIPANOSOMÁTIDOS EN MAMÍFEROS RESERVORIOS

El rol de los mamíferos como reservorios del parásito revela otra compleja asociación. Estudios previos han determinado que los grupos de mamíferos que presentan mayor infección con *T. cruzi* son marsupiales, edentados y roedores (Fernandes *et al.*, 1997, Pinto *et al.*, 2006, Rozas *et al.*, 2007, Xavier *et al.* 2007). Los resultados en este estudio demuestran una infección general con *T. cruzi* de 17,1% en tres ordenes principales: Rodentia, Didelphiomorpha y Chiroptera. El porcentaje de infección con *T. rangeli* es bajo (0,6%) y puede ser explicado por el hecho de que los mamíferos son capaces de generar una reacción inmune frente a esta especie de parásito, lo que elimina la infección y genera resistencia a re-infecciones (Añez *et al.*, 1985; Basso *et al.*, 1991).

La infección por *T. cruzi* en mamíferos en Manabí y Loja tiene patrones diferentes. En Manabí, los marsupiales son los principales reservorios del parásito (54,1% de infección). Si bien *Philander opossum* presenta la infección más alta (66,7%), *Didelphis marsupialis* es más abundante y debido a su alto índice de infección (62,1%) puede ser considerado el principal reservorio del parásito en esta área. De hecho, los marsupiales junto con los edentata son considerados los reservorios ancestrales de *T. cruzi*, siendo los marsupiales del género *Didelphis*, los reservorios que tienen una interacción única con el parásito debido a su capacidad de mantener parásitos en sus glándulas anales (Noireau *et al.*, 2009; Pinho *et al.*, 2000). Sin embargo, es importante considerar que también se

encontró una importante tasa de infección en ratones comunes (*Mus musculus*) del peridomicilio (33,3%), y por la facilidad que tiene esta especie de desplazarse entre el interior y el exterior de los domicilios, puede representar una fuente de infección de *T. cruzi* para los triatominos que logren ingresar a las viviendas, que a su vez resultaría en un incremento del riesgo de transmisión humana. Además, de acuerdo a la tasa de infección con *T. cruzi* por hábitat, los mamíferos capturados en el peridomicilio presentan el mayor índice de infección, lo que es consistente con los altos índices de infestación con triatominos en este hábitat y con las altas tasas de infección con *T. cruzi* de los vectores, por lo tanto los mamíferos de este hábitat, con comportamiento sinantrópico, deben ser considerados un factor de riesgo para la transmisión y mantenimiento de poblaciones de *T. cruzi*.

En la provincia de Loja, el escenario es diferente. Se encontró una mayor diversidad de especies de mamíferos infectados con *T. cruzi*, especialmente en lo que se refiere a roedores. De particular interés, por sus características sinantrópicas y su abundancia, son las altas infecciones encontradas en ratas del género *Rattus*, en ratones (*M. musculus*) y en raposas (*D. marsupialis*) en el área de domicilio y peridomicilio, y en particular, el área de domicilio donde la infección en roedores es alta (> 15%) e incrementa el riesgo de transmisión de *T. cruzi* a humanos. En el área selvática, el roedor de importancia es al parecer la ardilla (*Sciurus stramineus*) debido a que se ha reportado un alto índice de infestación con el vector *R. ecuadoriensis* en los nidos de esta especie de roedor (Grijalva y Villacís, 2009) y una alta tasa de infección con *T. cruzi* (36,4%), y podría ser una de las principales fuentes de mantenimiento de poblaciones de *T. cruzi* en este hábitat. Además, si consideramos que la distribución de *S. stramineus* se extiende desde la costa centro y sur y las estribaciones suroccidentales bajo los 2 000 msn (Tirira, 2007) podemos ver que esta distribución se solapa con la de *R. ecuadoriensis*, lo que indica

que ambas especies podrían estar implicadas en el mantenimiento de las poblaciones naturales de *T. cruzi*, así como su dispersión, por lo que un estudio enfocado a la conexión entre *S. stramineus*- *R. ecuadoriensis*-*T. cruzi* se hace necesario . Otro grupo de interés son los murciélagos (Chiroptera) que tienen capacidad de adquirir y mantener la infección con *T. cruzi* sea mediante picadura del vector o mediante ingestión de vectores infectados (Thomas *et al.*, 2007). En este estudio, el vampiro común, *Desmodus rotundus* e individuos del género *Anoura spp.* presentaron índices de infección con *T. cruzi* superiores al 30%. Estos murciélagos fueron capturados tanto en domicilio como en el hábitat silvestre, lo que significa una alerta para considerar a los murciélagos como posibles fuentes de infección y flujo de parásitos entre los ciclos de transmisión.

La presencia de *T. cruzi* en una amplia diversidad de mamíferos, en particular roedores, tiene una gran importancia epidemiológica, debido a que estos mamíferos tienen un comportamiento sinantrópico y circulan fácilmente entre el área domiciliar, peridomiciliar y silvestre, lo que influye en su rol tanto en el mantenimiento como en la dispersión del parásito. Si bien características como la dispersión geográfica y su relación con ambientes que convergen con actividades humanas son aspectos importantes para entender los diferentes escenarios de transmisión, el conocer la dinámica de la población de *T. cruzi* nos permite especular sobre la particular importancia de los reservorios en la transmisión de la ECh a humanos. Este aspecto será discutido más adelante (ver sección 6.4.3.2).

6.3. LINAJE TcI DE *T. cruzi* CIRCULANDO EN EL ECUADOR

El único linaje de *T. cruzi* identificado en este estudio fue TcI, lo que indica que este es el principal linaje circulando tanto en Loja como en Manabí, aunque no se puede

descartar la presencia de otros linajes. Este resultado confirma que TcI es el principal linaje circulando en el norte de América del Sur, como lo establecen previos reportes de su presencia en Colombia (Falla *et al.*, 2009; Mejía-Jaramillo *et al.*, 2009) y Venezuela (Añez *et al.*, 2004). No se encontró que su distribución esté relacionada con la especie de hospedero (vector o reservorio) o con el origen geográfico. Si bien varios estudios sugieren la asociación de determinados linajes con hospederos y ecotopos determinados (Yeo *et al.*, 2005; Rozas *et al.*, 2007), los resultados del análisis de distancias genéticas y cálculos de F_{ST} evidenció que los ciclos de transmisión (domiciliar, peridomiciliar y silvestre) son los que tienen mayor influencia sobre la diversidad de las poblaciones de parásitos, lo que concuerda con los resultados obtenidos en otros estudios (Llewellyn *et al.*, 2009a, Llewellyn *et al.*, 2009b). Para el caso específico del linaje TcI, estudios previos (Herrera *et al.*, 2008; Llewellyn *et al.*, 2009a) han propuesto que los ciclos de transmisión son los mayores generadores de diferenciación poblacional del linaje TcI en el norte de América del Sur.

Como se mencionó anteriormente, la presencia de otros linajes de *T. cruzi* circulando en Ecuador no puede descartarse. De hecho, existe un reporte previo de que identificó los linajes TcI y TcII (que para entonces no tenía definidas las sub-divisiones que actualmente se conocen) además de zimodema III (TcIV) en aislados de pacientes y vectores de la provincia de Guayas (Garzón *et al.*, 2002). Adicionalmente, aislados correspondientes a lo que antes se conocía como linaje II y ahora se reconoce como linajes independientes (que incluye TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI según la nueva nomenclatura), y que son más frecuentes en el sur de América del Sur (Miles *et al.*, 2009), han sido reportados en la parte norte de América del Sur (Montilla *et al.*, 2002, Llewellyn *et al.*, 2009b) y Centroamérica (Bosseno *et al.*, 2002, 2009, Pennington *et al.*, 2009); si bien su frecuencia es mucho menor a TcI y está asociado a hospederos como las ratas de campo de

los géneros *Proechimys spp.*, *Aegialomys spp.* (antes *Oryzomys*), guatusas (*Dasyprocta spp.*) (Marcili *et al.*, 2009) y armadillos (*Dasybus spp.*) (Yeo *et al.*, 2005). En este estudio se colectaron individuos de los géneros *Proechimys* y *Aegialomys*, pero estas especies tienen baja frecuencia de captura en Ecuador y no se detectó la presencia de tripanosomátidos. No obstante, se hace importante el diseñar un estudio enfocado a obtener muestras de estos mamíferos y determinar la presencia de otros linajes de *T. cruzi* y sus posibles asociaciones.

6.4. ANÁLISIS DE LA GENÉTICA DE POBLACIONES DE *T. cruzi* (LINAJE TcI) Y SU INFLUENCIA EN LA TRANSMISIÓN DE LA ECh

6.4.1. IMPORTANCIA DEL MUESTREO

Si bien la forma de reproducción y la estructura poblacional, de los agentes causales de enfermedades parasitarias importantes para el ser humano, como la tripanosomiasis africana y la leishmaniasis, han podido ser delineadas en base a análisis de muestras con una composición restringida (Kuhls *et al.*, 2008; Rougeron *et al.*, 2009; Koffi *et al.*, 2009; Morrison *et al.*, 2009), la diversidad de las muestras que son incluidas en un análisis afectan directamente a la habilidad de realizar inferencias precisas sobre la genética y la dinámica de las poblaciones bajo estudio. El obtener el muestreo ideal es un proceso complejo y depende de varios factores. En el caso de este estudio, la cantidad de aislados incluidos en el análisis fue influenciada directamente por factores no controlables como la abundancia de hospederos, la frecuencia de la infección con el parásito, la cantidad de parásitos presentes en las muestras aisladas y el éxito de su propagación en medios de cultivo *in vitro*. A pesar de esto, una de las fortalezas de este estudio es la composición de muestras obtenidas debido a que provienen de una amplia diversidad en cuanto a hábitats

(domicilio, peridomicilio y silvestre) e incluye las principales especies tanto de reservorios (*D. marsupialis*, *R. rattus*, *S. stramineus*) como de vectores (*R. ecuadoriensis*, *P. chinai*, *T. carrioni* y *P. howardi*); además, este estudio restringe el análisis de la dinámica de la población de *T. cruzi* a una escala geográfica limitada (provincias), lo que permite incluir y analizar de forma independiente los factores que influyen en cada zona. El rango geográfico que abarca las muestras obtenidas es amplio en el caso de la provincia de Loja, e incluye varias comunidades con información epidemiológica previa de la presencia de la ECh en la provincia de Manabí. A nivel epidemiológico, la importancia de los datos obtenidos al realizar estudios en escalas geográficas pequeñas es mayor que al hacerlo en grandes escalas, ya que la evaluación de los factores de riesgo de transmisión requiere de un conocimiento de las condiciones locales específicas (Abad-Franch *et al.*, 2010). La composición de muestras obtenida en una escala geográfica reducida nos permite hacer inferencias genéticas más precisas sobre la dinámica de las poblaciones de *T. cruzi* y minimiza los sesgos al trabajar únicamente con cierto tipo de aislados (cepas de laboratorio, cepas humanas).

6.4.2. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LOS AISLADOS DEL LINAJE TcI

6.4.2.1. INFLUENCIA DE LOS CICLOS DE TRANSMISIÓN

El control de las poblaciones de triatominos asociados con hábitats humanos es uno de los principales blancos de los programas de control de la ECh, con el objeto de reducir la incidencia de la enfermedad. Sin embargo, esta estrategia de control no tiene la efectividad deseada ya que no considera aspectos importantes como el flujo constante de triatominos entre los diferentes ciclos de transmisión dentro de las áreas endémicas ni tampoco la dinámica poblacional de los parásitos responsables de la enfermedad. En este

sentido, el análisis a nivel molecular permite tener información genética que puede ser aplicada en forma práctica sobre el diseño de estrategias de control. Una de las fortalezas de este tipo de información es que permite determinar tanto la variabilidad como la estructura poblacional de los hospederos y de los parásitos, y de esta forma se puede delinear los ciclos de transmisión del parásito con lo cual se pueden definir estrategias para reducir el riesgo de transmisión a humanos (Miles *et al.*, 2003). La ECh es un reto particular para la aplicación de la epidemiología molecular debido a sus complejas interacciones parásito-hospedero y su, aún no clara, asociación con los ciclos de transmisión. En este sentido, los tres ciclos de transmisión definidos (domiciliar, peridomiciliar y silvestre) se basan en sus asociaciones con la circulación de parásitos entre reservorios y vectores en áreas definidas por la actividad humana. Sin embargo, no podemos saber hasta qué punto esta división antropogénica se refleja en la asociación de los ciclos de transmisión a nivel molecular en vectores y parásitos. Los resultados obtenidos en los dendrogramas de las muestras de Manabí y Loja revelan el rol de los ciclos de transmisión como fuentes de la diversificación de parásitos, sin embargo, esta diversificación se da sólo a dos niveles: uno que envuelve tanto al área domiciliar y peridomiciliar y un segundo que involucra el área selvática. De hecho, en la provincia de Loja, de donde se analizaron aislados de los 3 hábitats (domicilio, peridomicilio y silvestre), no se evidenciaron diferencias significativas entre los aislados colectados en domicilio y peridomicilio ($F_{ST} = 0,027$, $p = 0,354$), por lo que fueron considerados parte de una sola población. Sin embargo, las diferencias fueron altamente significativas cuando se comparó el conjunto de aislados de domicilio y peridomicilio ($LOJA_{Dom/Peri}$) con los aislados silvestres $LOJA_{Silv}$ ($F_{ST} = 0,397$, $p = 0,000$). En el caso de la provincia de Manabí, la dinámica de la transmisión es distinta que en Loja, como lo demuestra el bajo número de aislados y de triatominos colectados en el hábitat domiciliar. En esta provincia, el peridomicilio podría estar funcionando como una barrera que impide la colonización del

interior del domicilio por parte de los triatominos. Al mismo tiempo, al ser el hábitat donde se refugian los vectores, el peridomicilio constituiría la principal fuente de transmisión de parásitos hacia los seres humanos. No obstante, y a pesar de la inestabilidad de las muestras, se encontró evidencia de la separación genética entre aislados del parásito del área de peridomicilio y del área silvestre. Esta misma estructura poblacional que separa a muestras asociadas al ambiente humano (domicilio/peridomicilio) y el silvestre también fue evidente en un análisis realizado en aislados del linaje TcI en muestras de Venezuela (Llewellyn *et al.*, 2009a).

Los aislados TcI de Ecuador fueron comparados con muestras del mismo linaje obtenidas en otras regiones del continente. Las muestras presentan un aislamiento relacionado con el origen geográfico y podemos observar que las muestras ecuatorianas forman un grupo independiente. Esto concuerda con resultados obtenidos en el estudio de Llewellyn *et al.* 2009a, en la que se reporta una correlación positiva entre la distancia geográfica y la distancia genética entre muestras de varias regiones de América. Sin embargo, contrasta con estudios en escalas geográficas más pequeñas (Herrera *et al.*, 2007, y Falla *et al.*, 2009) en las que son los ciclos de transmisión (domiciliar, peridomiciliar y silvestre) los que actúan como factores de divergencia más no la distancia geográfica. Un ejemplo de esto se evidenció en la falta de conectividad entre las poblaciones de $LOJA_{Dom/Peri}$ y VEN_{Dom} . Este resultado sugiere que la dinámica poblacional de los parásitos está ligada a las características epidemiológicas (circulación de parásitos en los hospederos) y ecológicas específicas del área geográfica estudiada, y que investigaciones en escalas geográficas amplias permiten delinear tendencias generales, más no la dinámica poblacional y su relación con la transmisión en áreas restringidas.

La influencia de las características específicas de áreas definidas también se ve reflejada a nivel de linajes del parásito. En el caso específico del linaje TcI, estudios previos (Herrera *et al.*, 2007, y Falla *et al.*, 2009) proponen que este linaje está ampliamente disperso a nivel geográfico y que su divergencia intraespecífica está directamente asociada con los ciclos de transmisión, independientemente de su distribución. Sin embargo, esto parece ser cierto a nivel local en Colombia, pero aparentemente no es aplicable a nivel regional. Al momento se está realizando una investigación sobre la variabilidad intraespecífica de los aislados TcI descritos en este trabajo, para conocer si en Ecuador se mantiene la tendencia de diversificación asociada a ciclos de transmisión que se observa en Colombia

6.4.2.2. EFECTO DE LA MULTICLONALIDAD

La presencia de multiclonalidad en poblaciones naturales de *T. cruzi* ocurre con frecuencia. Un triatomino puede alimentarse de distintos mamíferos infectados, y a su vez, los reservorios pueden ser infectados por múltiples contactos con diferentes triatominos. En este trabajo la mayoría de aislados obtenidos provienen de vectores, y la multiclonalidad se observa principalmente en los aislados de parásitos provenientes de este grupo de hospederos. Si bien la frecuencia general de multiclonalidad en *T. cruzi* no es conocida (Oliveira *et al.*, 1998), varios estudios han determinado que la multiclonalidad es la mayor fuente de la presencia de más de dos alelos en esta especie (Morel *et al.*, 1980; Macedo *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1998; Llewellyn *et al.* 2009a).

Como se señala en la sección de resultados (ver sección 5.3.2.1 y 5.3.3.1.), el efecto que puede tener la multiclonalidad de las muestras se puede ver reflejado en la fortaleza de la estructura poblacional encontrada para las poblaciones de Manabí y Loja.

En el caso de Manabí, la proporción de muestras multiclonales es sumamente alta, especialmente en el peridomicilio. Sin embargo, es imposible determinar si la multiclonalidad en las muestras selváticas es equivalente o menor a la encontrada en el ciclo de peridomicilio debido a que sólo se analizó nueve muestras provenientes de vectores silvestres, y se requieren más muestras para comprobar esta tendencia. Por lo tanto, no podemos hacer inferencias claras sobre la dinámica de la población de *T. cruzi* en esta provincia. Sin embargo se encontraron evidencias, como los resultados de las distancias genéticas (D_{AS}) y los valores F_{ST} , que apoyan la tendencia de la división de dos poblaciones dentro de Manabí, una relacionada con el hábitat peridomiciliar y la otra con el hábitat silvestre. Cabe mencionar que el no haber podido tener un resultado congruente con el programa STRUCTURE puede deberse a la naturaleza de este análisis, considerando que fue diseñado para poblaciones sexuales, y podría presentar inestabilidad de resultados al trabajar con poblaciones clonales. Para poder clarificar la dinámica de las poblaciones de *T. cruzi* en Manabí, actualmente se está llevando a cabo un proyecto que busca ampliar la cobertura geográfica de los aislados en esta provincia, y basados en los datos de este estudio se hace imperativo que los análisis se realicen en muestras clonales.

En el caso de las muestras de Loja, la mayor proporción de multiclonalidad se encuentra en la población con genotipo $LOJA_{Domi/Peri}$, sin embargo, al parecer esto no influyó en la estructura de las dos poblaciones definidas $LOJA_{Dom/Peri}$ y $LOJA_{Silv}$ cuya rama de separación mostró una fortaleza del 56,5%. La estabilidad de esta rama se confirmó con una congruencia de 100% que se obtuvo después de correr 1 000 bases de datos diploides aleatorias, es decir, que el 100% de las veces las muestras analizadas fueron asignadas a la misma población. En este caso, se puede decir que la multiclonalidad no está afectando la asignación de las muestras a cada población, por lo que asumimos la presencia de dos genotipos circulando en la provincia de Loja.

6.4.2.3. LOJA: EVIDENCIA DE REPRODUCCIÓN CLONAL EN LA POBLACIÓN $LOJA_{Silv}$ Y REPRODUCCIÓN SEXUAL EN LA POBLACIÓN $LOJA_{Dom/Peri}$

Varios organismos patogénicos de importancia médica como *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* y *Trypanosoma* han sido considerados como parásitos con una estructura poblacional clonal, en su totalidad o en parte de su ciclo de vida (Tibayrenc *et al.*, 1990), lo que ha llevado a caracterizar los clones en áreas específicas y relacionar características genéticas con los eventos epidemiológicos y médicos de cada enfermedad. Sin embargo, estudios en *Leishmania spp.* (Kuhls *et al.*, 2008; Rougeron *et al.*, 2009), *T. brucei* (Koffi *et al.*, 2008) y *T. congolense* (Morrison *et al.*, 2009) han encontrado evidencia de reproducción sexual mucho más frecuente de lo esperado y con características específicas en escalas geográficas limitadas, lo que está cambiando el enfoque del análisis de los patrones de transmisión de estas enfermedades. En este sentido, *T. cruzi*, que ha sido uno de los paradigmas de una población clonal, no es la excepción. A pesar de que varios estudios confirmaban la predominancia de la reproducción clonal con raros o ausentes eventos de segregación y recombinación (reproducción sexual) (Tibayrenc *et al.*, 1990; Tibayrenc y Ayala, 2002), evidencia de eventos de hibridización, en poblaciones naturales (Machado y Ayala, 2001) y la confirmación de intercambio genético en experimentos de laboratorio (Gaunt *et al.*, 2003) han cuestionado la predominante clonalidad de *T. cruzi*. De hecho, dos de los linajes de *T. cruzi*, TcV y TcVI, son el resultado de eventos de hibridización. En este estudio, un resultado importante derivado del análisis genético es la fuerte evidencia de reproducción sexual entre aislados de la población $LOJA_{Dom/Peri}$ mientras que se observó el proceso de proliferación clonal esperada en la población $LOJA_{Silv}$. Varios parámetros genéticos sustentan esta tendencia. Por ejemplo, En organismos clonales se genera una asociación

estadística de alelos entre diferentes loci (desequilibrio de ligamiento) (de Meeus *et al.*, 2006), como se observa en la población $LOJA_{Silv}$ (0,597; $p < 0,001$), y este valor va disminuyendo cuando se incrementa la tasa de reproducción sexual (de Meeus *et al.*, 2006), como se evidencia en la población $LOJA_{Dom/Peri}$ (0,227; $p=0,063$). Otra consecuencia de la clonalidad, es la reducción de diversidad en el número de genotipos multilocus (de Meeus *et al.*, 2006) y este fenómeno es evidente en la población $LOJA_{Silv}$ (G/N =54/63) frente a la población sexual $LOJA_{Dom/Peri}$ en la que todos los individuos analizados corresponden a un genotipo multilocus diferente (G/N =18/18).

En organismos predominantemente clonales, se espera que, por ausencia de segregación, se produzca un incremento en la heterocigocidad, a través de la acumulación de mutaciones en cada locus (de Meeus *et al.*, 2006). No obstante, se calculó un alto déficit de heterocigocidad (44,4% PL H_D) para la población silvestre ($LOJA_{Silv}$), que se encontró que era principalmente clonal. Este resultado concuerda con otros análisis en *T. cruzi* en los que se observa mayor déficit de heterocigocidad en lugar de exceso del mismo (Llewellyn, 2009^a, Llewellyn, 2009b)

Estos resultados generan varias interrogantes a nivel de la biología y genética de *T. cruzi* y desafían varios conceptos básicos como la predominante clonalidad y la acumulación de heterocigocidad. Además, otros aspectos de la genética de este parásito quedan pendientes, por ejemplo, sería importante conocer en qué hospedero está ocurriendo este intercambio genético y los mecanismos por los cuales se está llevando a cabo. Probablemente, ocurre lo que en otros parásitos cercanos como *T. brucei* (Gibson y Stevens, 1999) y *Leishmania spp.* (Akopyants *et al.*, 2009) en donde se ha visto que el intercambio genético se estaría llevando a cabo en el vector. Sin embargo, mucho queda aún por investigar para responder estas preguntas y encontrar su significado epidemiológico.

6.4.2.4. ESTRUCTURA POBLACIONAL EN RELACIÓN CON LA DISTANCIA GEOGRÁFICA

Como se menciona en la sección de Materiales y Métodos (sección 4.8.9), este análisis fue realizado únicamente con las muestras de la provincia de Loja debido a que el radio de muestreo es de aproximadamente 50 km y abarca la mayor parte de la extensión geográfica de la provincia; lo que no ocurre con el muestreo de Manabí que está restringido a un radio de alrededor de 15 km y abarca únicamente una zona del cantón Portoviejo.

El análisis de correlación entre distancia genética y distancia geográfica en las muestras de la provincia de Loja muestra una diversificación espacial entre los aislados silvestres (*LOJA_{Silv}*). Este es un resultado esperado si consideramos las características ecológicas de Loja que es una zona montañosa con elevaciones de más de 2 500 m.s.n.m. y que constituyen una barrera geográfica para la migración de vectores y reservorios. Este aislamiento geográfico y poco flujo genético entre poblaciones selváticas coincide con una estructura espacial previa determinada con muestras de TcI de varias regiones de América (Llewellyn *et al.*, 2009a). Sin embargo, las poblaciones que corresponden al genotipo *LOJA_{Dom/Peri}* están distribuidas aleatoriamente a lo largo de toda la provincia, lo que sugiere que las barreras geográficas, en este caso, no están influyendo en el flujo genético. Esta estructura espacial podría estar ligada a una dispersión de parásitos, en hospederos infectados, influenciada por factores antropogénicos ya sea por transporte pasivo de vectores ó comercio de animales; sin embargo, y como se discute más adelante (ver sección 6.4.3.2.) no se debe descartar la potencial influencia de mamíferos sinantrópicos en esta dispersión. Otro punto, discutido anteriormente, pero importante para recalcar es la importancia de la interpretación de estos resultados a nivel local, debido a que las

características epidemiológicas que influyen en estos patrones deben ser consideradas bajo un contexto específico, un ejemplo de esto es un estudio realizado en comunidades indígenas de Colombia, en el que se analizaron las similitudes genéticas de *T. cruzi* entre comunidades y, a diferencia de lo encontrado con las muestras de Loja, encontraron un solapamiento de los ciclos de transmisión domiciliar y silvestre, con los vectores jugando un rol importante en la transmisión en esa zona (Rodríguez *et al*, 2009); para este caso en particular, la influencia de hospederos que generan un vínculo entre los ciclos domiciliar y silvestre son de importancia epidemiológica y deben ser el principal punto de vigilancia al implementar un programa de control; mientras que en el caso de Loja, la dispersión de parásitos estaría más relacionada con actividades antropogénicas y las medidas de control y prevención involucrarían la detección de las fuentes de transporte de hospederos infectados.

6.4.3. ROL DE VECTORES Y RESERVORIOS EN LOS CICLOS DE TRANSMISIÓN: EVENTOS DE INVASIÓN Y DISPERSIÓN DE PARÁSITOS

El control de la ECh es un reto debido a que el ciclo de transmisión silvestre se mantiene en complejas interacciones con mamíferos y vectores. Si bien, en este estudio, la separación entre poblaciones de domicilio/peridomicilio y selvática es clara a nivel estadístico, los aislados de Manabí y Loja muestran la presencia de aislados colectados en la zona de domicilio/peridomicilio, que fueron caracterizados con genotipo silvestre y viceversa, lo que evidencia que hay eventos de invasión que están ocurriendo en ambas direcciones y que hay flujo genético entre estos dos ambientes, aunque este flujo no es lo suficientemente frecuente como para romper la divergencia entre estas dos poblaciones. No obstante, la complejidad de los ciclos de transmisión se debe analizar a todo nivel. A

continuación se realizará un análisis del papel que podrían estar jugando los vectores y mamíferos involucrados en el transporte de los parásitos de un ciclo de transmisión a otro.

6.4.3.1. INFLUENCIA DE LOS VECTORES

Las estrategias de control vectorial están influenciadas por varios factores, entre las más importantes están el conocimiento de la distribución y la estructura poblacional de los vectores especialmente en ambientes en donde hay mayor riesgo de transmisión a humanos (viviendas y alrededores) (Abad-Franch *et al.*, 2010). Estudios previos se han enfocado en la influencia de la estacionalidad y las tasas de infección de *T. cruzi* en diferentes especies de vectores, y los resultados remarcan, nuevamente, la importancia de los estudios a pequeña escala. Por ejemplo, en Colombia, las poblaciones no domiciliadas del vector *T. dimidiata* pueden colonizar viviendas por lo que representan un riesgo de transmisión (Ramírez *et al.*, 2005); sin embargo, un estudio similar realizado en Bolivia con el vector *T. infestans* demuestra que las condiciones en esa área no favorecen el flujo entre poblaciones de vectores de ambientes silvestres y domiciliarios (Richer *et al.*, 2007). En Ecuador, la tasa de colonización de triatominos silvestres a zonas de domicilio y peridomicilio no ha sido definida aún, sin embargo la presencia de poblaciones selváticas en las áreas de estudio (Loja y Manabí) ha sido reportada, siendo el vector *R. ecuadoriensis* la principal especie encontrada en áreas selváticas (Grijalva y Villacís, 2009; Suarez-Davalos *et al.*, 2010). En las muestras de parásitos aisladas de vectores, el haber encontrado el genotipo silvestre en vectores colectados en el ambiente domiciliar/peridomiciliar, sugiere que se están produciendo eventos de invasión de vectores desde el hábitat silvestre. Sin embargo, se desconoce la frecuencia de estos procesos invasivos.

Durante este proceso invasivo, se esperaría que el único vector del área silvestre, *R. ecuadoriensis*, presente infecciones con el genotipo silvestre de *T. cruzi*. Sin embargo, el reporte de infección con el genotipo silvestre de *T. cruzi*, en especies restringidas a zonas domiciliarias como *P. chinai* y *T. carrioni*, junto con la baja eficiencia en la transmisión vectorial (1/650 picaduras en *T. infestans*) (Rabinovich *et al.*, 1990), cuestiona la implicación de los vectores en la vinculación entre los ciclos de transmisión domiciliar/peridomiciliar y silvestre, por lo que otras alternativas deben ser analizadas, por ejemplo la influencia de los reservorios (sección 6.4.3.2).

6.4.3.2. INFLUENCIA DE LOS RESERVORIOS

Identificar las especies de mamíferos que cumplen el rol de reservorios en un área determinada constituye información crucial para el diseño de medidas de control. Sin embargo, las actuales iniciativas de control no consideran el papel que cumplen los reservorios tanto en el mantenimiento de parásitos circulantes como en transporte de parásitos entre ciclos de transmisión y entre áreas geográficas. El ciclo de transmisión silvestre ha sido de particular interés por ser considerado como una posible fuente de parásitos para la transmisión humana (Cortez *et al.*, 2006; Rademaker *et al.*, 2009); sin embargo, como se analiza en la sección 6.2, los mamíferos sinantrópicos (ratas, ratones, raposas) parecen tener un rol importante en el mantenimiento de poblaciones de parásitos en los ciclos de transmisión en Loja y Manabí debido a sus altos índices de infección con *T. cruzi*. En Loja, los individuos de la especie *R. rattus* se encuentran infectados con ambos genotipos de parásito ($LOJA_{Dom/Peri}$ y $LOJA_{Silv}$), lo que no ocurre con *D. marsupialis*, que se encuentran infectados únicamente con el genotipo de domicilio/peridomicilio ($LOJA_{Dom/Peri}$, $MANABI_{Peri}$). Si bien el número de aislados provenientes de reservorios es bajo, los resultados sugieren que en Loja, a diferencia de lo que sucede en Manabí, *R.*

rattus puede estar jugando el papel de vínculo de parásitos entre los ciclos de transmisión silvestre y domiciliar/peridomiciliar. Esto contrasta con la opinión prevalente que considera a los didélfidos como los principales conectores entre estos ciclos de transmisión (O'Connor *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2008). Otra evidencia que apoya la idea de la influencia de los mamíferos como conectores entre los ciclos de transmisión es el hecho de haber encontrado individuos adultos de las especies de vectores *P. chinai* y *T. carrioni* infectadas con el genotipo silvestre *LOJA_{Silv.}*. Estas especies han sido reportadas únicamente a nivel de infestación en domicilio y peridomicilio y a pesar de las intensas búsquedas realizadas hasta el momento, no se han detectado poblaciones selváticas (Grijalva MJ, comunicación personal). En este sentido, la infección con el genotipo silvestre podría ser el resultado del contacto con mamíferos invasivos, lo que a su vez estaría reflejando los cambios locales en el entorno, causados por la actividad humana. En base a estos resultados, los mamíferos podrían tener un rol más importante en la vinculación de ciclos de transmisión de *T. cruzi* de lo que se había considerado en el pasado.

7. CONCLUSIÓN

T. cruzi es un parásito altamente variable y su ciclo de vida involucra complejas interacciones del parásito con sus hospederos y su ambiente. En este sentido, la epidemiología molecular es una herramienta que nos permite hacer inferencias sobre la influencia de la genética de los parásitos sobre los riesgos de transmisión de la ECh. Además, los resultados de este estudio demuestran que el conocimiento de la dinámica de las poblaciones de los parásitos no sólo nos permiten detectar eventos genéticos importantes, como la sexualidad en poblaciones naturales de un organismo considerado principalmente clonal, sino también inferir sobre la significancia epidemiológica de dichos eventos genéticos.

Este estudio demostró que las características intrínsecas de una región son determinantes en la dinámica de poblaciones de los parásitos y este hecho se ve reflejado en las diferencias epidemiológicas encontradas en Manabí y Loja. La provincia de Loja presenta características entomológicas en las que la estrategia clásica de rociamiento de viviendas y vigilancia es aplicable, y, si es sostenida a largo plazo, podría disminuir la transmisión de la ECh a humanos mediante el control de especies de triatomos restringidas al ambiente domiciliar. Sin embargo, otros factores importantes deben ser considerados, como por ejemplo la abundante presencia de triatomos silvestres. Si bien estos triatomos aparentemente no constituyen la fuente principal de los parásitos que están en el ambiente domiciliar, es importante mantener un seguimiento sobre la dinámica de estas poblaciones por su potencial capacidad de transportar *T. cruzi* entre ciclos de transmisión. Otro factor importante es la condición socio-económica de las personas que viven en áreas de transmisión. Si bien las estrategias de control químico pueden reducir la

población vectorial, la exposición de la población a factores de riesgo de transmisión permanece intacta. Un estudio previo realizado por Black *et al.*, 2007 determinó que los factores de riesgo asociados con la transmisión de *T. cruzi* estaba relacionado con el tipo de construcción de las viviendas (techos de palma, paredes de caña y adobe). En ese sentido, sin un cambio real de las condiciones de vida de la población, la llegada de vectores de áreas silvestres o el resurgimiento de poblaciones residuales (no afectadas por químicos) encontrarían las condiciones ideales para la colonización con lo que la efectividad de las medidas de control sería únicamente parcial. Además, los resultados de este estudio ponen en cuestionamiento las estrategias de control utilizadas en la actualidad, las cuales se basan únicamente en el control vectorial pero no consideran otros factores importantes de transmisión, como se demostró en Loja, en donde las actividades antropogénicas y los reservorios tienen implicaciones importantes en la dispersión de los parásitos en el área domiciliar y peridomiciliar. Diseñar estrategias para frenar el flujo de triatominos y reservorios infectados entre los ambientes domiciliar y peridomiciliar a lo largo de la provincia de Loja es crucial. Dichas estrategias deben ser mixtas, incluyendo control vectorial, control de plagas (roedores), fortalecimiento de sistemas de vigilancia comunitaria con una respuesta efectiva por parte de los organismos relacionados (Ministerio de Salud, gobiernos locales), mejoramiento de las condiciones de vivienda y campañas constantes y amplias de educación en prevención y detección de la ECh a nivel comunitario y médico.

En Manabí, en cambio, el panorama es totalmente diferente. En esta provincia las interacciones hospedero-parásito son aparentemente más complejas y esto se vio reflejado en los altos niveles de multiclonalidad que impidieron hacer inferencias claras sobre la dinámica de poblaciones del parásito en esta provincia. Para conocer la dinámica de los ciclos de transmisión en Manabí se necesita incrementar la cobertura geográfica del origen

de las muestras, obtener más aislados silvestres y realizar un proceso de clonación de los aislados. A pesar de eso, la información obtenida nos permite ver que la estrategia clásica de control vectorial aplicada en esta provincia, no es viable debido a la ausencia de vectores domiciliados, la complejidad del escenario peridomiciliar y la falta de información sobre la influencia de las poblaciones selváticas, por lo que se debe buscar estrategias alternativas.

8. LITERATURA CITADA

- Abad-Franch, F., Paucar, A., Carpio, C., Cuba-Cuba, C. A., Aguilar, H. M. and Miles, M. A. 2001. Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: Implications for the design of control strategies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 611–620.
- Abad-Franch, F. y Aguilar, H. M. 2003. Control de la Enfermedad de Chagas en el Ecuador. Organización Panamericana de la Salud - Ministerio de Salud Pública del Ecuador.
- Abad-Franch, F., Ferraz, G., Campos, C., Palomeque, F. S., Grijalva, M. J., Aguilar, H. M. and Miles, M. A. 2010. Modeling disease vector occurrence when detection is imperfect: infestation of Amazonian palm trees by triatomine bugs at three spatial scales. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (3): e620.
- Aguilar, H. M., Abad-Franch, F., Racines, V. and Paucar, A. 1999. Epidemiology of Chagas disease in Ecuador: a brief review 94 (Suppl.I): 387–393.
- Aguilar, H. M., Abad-Franch, F., Dias, J. C., Junqueira, A. C. and Coura, J. R. 2007. Chagas disease in the Amazon region. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (Suppl I): 47–56.
- Agapow, P. M. and Burt, A. 2000. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* 1: 101–102.
- Akopyants, N. S., Kimblin, N., Secundino, N., Patrick, R., Peters, N., Lawyer, P., Dobson, D. E., Beverley, S. M. and Sacks, D. L. 2009. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science* 324 (5924): 265–268.
- Almeida, C. E., Vinhaes, M. C., Almeida, J. R., Silveira, A. C. and Costa, J. 2000. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the state of Rio Grande de Sul, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95 (6): 761–768.
- Anónimo, 2007. Workshop on epidemiology and social determining factors of Chagas Disease. Basic information for surveillance and control policy in Latin América. Introduction, regional context, precedings and recommendations. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. I): 5–10.
- Añez, N., Velandia, J. and Rodríguez, A. M. 1985. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VIII. Response to reinfections in two mammals. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 80 (2): 149–153.
- Añez, N., Crisante, G., da Silva, F. M., Rojas, A., Carrasco, H., Umezawa, E. S., Stolf, A. M., Ramírez, J. L. and Teixeira, M. M. 2004. Predominance of lineage I among *T. cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chaga's disease. *Tropical Medicina and Internatonal Health* 9 (12): 1319–1326.

- Ashford, R. W., 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in dermatology* 14: 523–532.
- Basso, B., Moretti, E. R. and Vottero-Cima, E. 1991. Immune response and *Trypanosoma cruzi* infection in *Trypanosoma rangeli*-immunized mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44 (4): 413–419.
- Black, C. L., Ocaña, S., Riner, D., Costales, J. A., Lascano, M. S., Davila, S., Arcos-Terán, L., Seed, R. and Grijalva, M. J. 2007. Household risk factors for *Trypanosoma cruzi* seropositivity in two geographic regions of Ecuador. *Journal of Parasitology* 93 (1): 12–16.
- Black, C. L., Ocaña-Mayorga, S., Riner, D. K., Costales, J. A., Lascano, M. S., Arcos-Terán, L., Preisser, J. S., Seed, J. R. and Grijalva, M. J. 2009. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in rural Ecuador and clustering of seropositivity within households. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81 (6): 1035–1040.
- Bosseno, M. F., Barnabé, C., Magallón Gastélum, E., Lozano Kasten, F., Ramsey, J., Espinoza, B. and Breniere, S. F. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology* 40 (2): 627–632.
- Bosseno, M. F., Barnabé, C., Sierra, M. J., Kengne, P., Guerrero, S., Lozano, F., Ezequiel, K., Gatélum, M. and Breniere, S. F. 2009. Wild ecotopes and food habits of *Triatoma longipennis* infected by *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80 (6): 988–991.
- Brisse, S., Dujardin, J. C. and Tibayrenc, M. 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and Biochemical Parasitology* 111 (1): 95–105.
- Brisse, S., Verhoef, J. and Tibayrenc, M. 2001. Characterisation of a large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International Journal of Parasitology* 31 (11): 1218–1226.
- Britto, C., Cardoso, M. A., Vanni, C. M., Hasslocher-Moreno, A., Oelemann, W., Santoro, A., Pirmez, C., Morel, C. M. and Wincker, P. 1995. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 110: 241–247.
- Brutus, L., Schneider D., Postigo, J., Romero, M., Santalla, J. and Chippaux, J. P. 2008. Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. *Acta Tropica* 106 (3): 195–199.
- Caballero, Z. C., Sousa, O. E., Marques, W. P., Saez-Alquezar, A. and Umezawa, E. S. 2007. Evaluation of serological test to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania spp.* *Clinical and vaccine immunology* 14(8): 1045–1049.
- Calderón Arguedas, O., Troyo, A. and Chinchilla, M. 2004. Infección natural de *Panstrongylus rufotuberculatus* con *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Costa Rica. *Parasitología Latinoamericana* 59: 65–67.
- Carbajal de la Fuente, A. L., Minoli, S. A., Lopes, C. M., Noireau, F., Lazzari, C. R. and Lorenzo, M. G. 2007. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma*

- brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. *Acta Tropica*. 101 (2): 115–119.
- Carcavallo, R. U., Galíndez Girón, I., Jurberg, J. and Lent H. 1998. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas, Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.
- Carranza, J. C., Valadares, H. M., D'Ávila, D. A., Baptista, R. P., Moreno, M., Galvao, L. M., Chiari, E., Sturm, N. R., Gontijo, E. D., Macedo, A. M. and Zingales, B. 2009. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas Disease patients from Brazil. *International Journal of Parasitology* 39 (9): 963–973.
- Carreira, J. C. A., Jansen, A. M. de Nazareth Meirelles, M., Costa e Silva, F. and Lenzi, H. L. 2001. *Trypanosoma cruzi* in the scent glands of *Didelphis marsupialis*: kinetics of colonization. *Experimental Parasitology* 97: 129–140.
- CELADE/CEPAL, 2008. Características de la migración internacional en América Latina y el Caribe. En: América Latina y el Caribe: migración internacional, derechos humanos y desarrollo. Capítulo II (J. Martínez Pizarro, ed) pp. 83–183. Naciones Unidas, Santiago de Chile, Chile.
- Cordeiro, A. T., Michels, P. A. M., Delboni, L. F and Thiemann, O. H. 2004. The crystal structure of glucose-6-phosphate isomerase from *Leishmania Mexicana* reveals novel active site features. *European journal of biochemistry* (271): 2765–2772.
- Corrales, R. M., Mora, M. C., Negrette, O. S., Diosque, P., Lacunza, D., Virreira, M., Brenière, S. F. and Basombrio, M. A. 2009. Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary genetics in infectious Diseases* 9 (2): 278–282.
- Cortez, M. R., Pinho, A. P., Cuervo, P., Alfaro, F., Solano, M., Xavier, S. C., D'Andrea, P. S., Fernandes, O., Torrico, F., Noireau, F. and Jansen, A. M. 2006. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): ecology of the transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba, Bolivia. *Experimental Parasitology* 114 (4): 305–313.
- Costa, J., Almeida, C. E., Dotson, E. M., Lins, A., Vinhaes, M., Silveira, A. C., Beard and C. B. 2003. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revisión of domiciliary captures during 1993-1999. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (4): 443–449.
- Costa, J. and Lorenzo, M. 2009. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines-Chagas disease vectors. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (Suppl. I): 46–51.
- Coura, J. R. and de Castro, S. L. 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (1): 3–24.
- Coura, J. R. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed—a background article. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. I): 113–122.
- Cuba Cuba, C. A., Abad-Franch, F., Roldán Rodríguez, J., Vargas Vásquez, F., Pollack Velásquez, L. and Miles, M. A. The triatomines of Northern Peru, with emphasis on the

- ecology and infection by trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (2): 175–183.
- De Meeus, T., Lehmann, L. and Balloux, F. 2006. Molecular epidemiology of clonal diploids: a quick overview and a short DIY (do it yourself) notice. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary genetics in infectious Diseases* 6 (2): 163–170.
- De Souza, W. 1999. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 19–36.
- Dias, J. C. P., Silveira, A. C. and Schofield, C. J. 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (5): 603–612.
- Dias, J. C. P. 2003. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas: una síntesis. Organización Panamericana de la Salud. XIIa Reunión Intergubernamental INCOSUR/Chagas, Santiago, Chile.
- Dias, J. C. P. 2007. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. I): 11–18.
- Dias, J. C. P., Prata, A. and Correia, D. 2008. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Revista da Sociedades Brasileira de Medicina Tropical* 41(2):193–196.
- Diez, C., Lorenz, V., Ortiz, S., Gonzalez, V., Racca, A., Bontempi, I., Manattini, S., Solari, A. and Marcipar, I. 2010. Genotyping of *Trypanosoma cruzi* sublineage in human samples from a North-East Argentina area by hybridization with DNA probes and specific polymerase chain reaction (PCR). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 82 (1): 67–73.
- Eichler, S. and Schaub, G. A. 2002. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Experimental Parasitology* 100 (1): 17–21.
- Excoffier, L., Laval, G. and Shneider, S. 2005. Arlequin (versión 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics online* 1: 47–50.
- Falla, A., Herrera, C., Fajardo, A., Montilla, M., Vallejo, G. A. and Guhl, F. 2009. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Tropica* 110 (1): 15–21.
- Fernandes, C. D., Murta, S. M., Cerávolo, I. P., Krug, L. P., Vidigal, P. G., Steindel, M., Nardi, N. and Romanha, A. J. 1997. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 92 (3): 342–351.
- Fernandes, O., Santos, S., Junqueira, A., Jansen, A., Cupolillo, E., Campbell, D., Zingales, B. and Coura, J. R. 1999. Population heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi*

- isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 195–197.
- Folgueira, C. and Requena, J. M. 2007. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS microbiology reviews* (31): 359–377.
- Garzón, E. A., Barnabé, C., Córdova, X., Bowen, C., Paredes, W., Gómez, E., Ouaisi, A., Tibayrenc, M. and Guevara, A. G. 2002. *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic chagasic patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96: 378–382.
- Gaunt, M. W., Yeo, M., Frame, I. A., Stothard, J. R., Carrasco, H. J., Taylor, M. C., Mena, S. S., Veazey, P., Miles, G. A., Acosta, N., de Arias, A. R. and Miles, M. A. 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* (6926): 936–939.
- Gibson, W. and Stevens, J. 1999. Genetic exchange in the trypanosomatidae. *Advances in parasitology* 43: 1–46.
- Goudet, J. 1995. FSTAT Version 1.2: A computer program to calculate F-statistics. *The Journal of Heredity* 86: 485–486.
- Grayson, M. L. and Wesselingh, S. 2002. Management of infectious diseases. *The Medical Journal of Australia* 176: 202–203.
- Grijalva, M. Director del Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Ohio, EEUU y del Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Escuela de Biología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Grijalva, M. J., Escalante, L., Paredes, R. A., Costales, J. A., Padilla, A., Rowland, E. C., Aguilar, H. M. and Racines, J. 2003. Seroprevalence and risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection in the Amazon región of Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69: 380–385.
- Grijalva, M. J., Palomeque-Rodríguez, F. S., Costales, J. A., Davila, S. and Arcos-Teran, L. 2005a. High household infestation rates by synanthropic vectors of Chagas Disease in Southern Ecuador. *Journal of Medical Entomology* 42(1): 68–74.
- Grijalva, M. J., Chiriboga, R. F., Vanhassel, H. and Arcos-Teran, L. 2005b. Improving the safety of the blood supply in Ecuador through external performance evaluation of serological screening of blood donors. *Journal of Clinical Virology* 34 (2): S47–S52.
- Grijalva, M. J. and Villacis, A. G. 2009. Presence of *Rhodnius ecuadoriensis* in sylvatic habitats in the southern highlands (Loja province) of Ecuador. *Journal of Medical Entomology* 46 (3): 708–711.
- Grijalva, M. J., Chiriboga, R., Cueva, G. and Crespo, C. 2009. Informe de resultados generales. Programa de Evaluación Externa del Desempeño. Multipanel-CIEI 114.
- Grijalva, M. J., Palomeque, F. S., Villacís, A. G., Black, C. L. and Arcos-Terán, L. 2010. Absence of domestic triatomine colonies in an area where Chagas disease is considered endemic in the coastal region of Ecuador. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 105 (5): 677–681.
- Guarneri, A. A., Pereira, M. H. and Diotaiuti, L. 2000. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida* and

- Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 37 (3): 373–379.
- Hancock, K., Zajac, A. M., Pung, O. J., Elvinger, F., Rosypal, A. C. and Lindsay, D. S. 2005. Prevalence of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in raccoons (*Procyon lotor*) from an urban area of northern Virginia. *The Journal of Parasitology* 31 (2): 470–472.
- Hartl, D.L. 2000. A primer of population genetics. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Herrera, C., Bargues, M. D., Fajardo, A., Montilla, M., Triana, O., Vallejo, G. A. and Guhl, F. 2007. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary genetics in infectious Diseases* 7 (4): 535–539.
- Herrera, H. M., Lisboa, C. V., Pinho, A. P., Olifiers, N, Bianhi, R. C., Rocha, F. L., Mourao, G. M. and Jansen, A. M. 2008. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102: 1133–1139.
- Huyse, T., Poulin, R. and Théron, A. 2005. Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends in Parasitology* 21 (10): 469–475.
- Kalinowski, S. T., 2004. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics* 5: 339–543.
- Kierszenbaum, F., Gottlieb, C. A. and Budzko, D. B. Antibody-independent, natural resistance of birds to *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of parasitology* 67(5): 656–660.
- Koffi, M., De Meus, T., Bucheton, B., Solano, P., Camara, M., Kaba, D., Cuny, G., Ayala, F. J. and Jamonneau, V. 2009. Population genetics of *Trypanosoma brucei gambiense*, the agent of sleeping sickness in Western Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (1): 209–214.
- Kuhls, K., Chicharro, C., Cañavate, C., Cortes, S., Campino, L., Haralambous, C., Soteriadou, K., Pratlong, F., Dedet, J. P., Maricio, I., Miles, M., Schaar, M., Ochsenreither, S., Radtke, O. A. and Schonian, G. 2008. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (7): e261.
- Lewis, M. D., Ma, J., Yeo, M., Carrasco, H. J., Llewellyn, M. S. and Miles, M. A. 2009. Genotyping *Trypanosoma cruzi*: Systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81(6): 1041–1049.
- Leberg, P. L. 2002. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology* 11: 2445–2449.
- Lent, H. and Wygoszinsky, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chaga's disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 163: 123–520.

- Lisboa, C. V., Pinho, A. P., Herrera, H. M., Gerhardt, M., Cupolillo, E. and Jansen, A. M. 2008. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Veterinary Parasitology* 156 (3-4): 314–318.
- Llewellyn, M. S., Miles, M. A., Carrasco, H. J., Lewis, M. D., Yeo, M., Vargas, J., Torrico, F., Diosque, P., Valente, V., Valente, S. A. and Gaunt, M. W. 2009a. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathogens* 5 (5): e1000410.
- Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Acosta, N., Yeo, M., Carrasco, H. J., Segovia, M., Vargas, J., Torrico, F., Miles, M. A. and Gaunt, M. W. 2009b. *Trypanosoma cruzi* IIc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3 (9): e510.
- López-Antuña, F., Rangel-Flores, H. and Ramos, C. 2000. Diagnosis of Chagas' disease. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42: 121–129.
- Luquetti, A. O., Ponce, C., Ponce, E., Esfandiari, J., Schijman, A., Revollo, S., Añez, N., Zingales, B., Rangel-Aldao, R., Gonzalez, A., Levin, M. J., Umezawa, E. S. and Franco da Silveira, J. 2003. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 46 (4): 265–271.
- Macedo, A. M., Martins, M. S., Chiari, E. and Pena, S. D. 1992. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Molecular and Biochemical Parasitology* 55 (1-2): 147–153.
- Machado, C. A. and Ayala, F. J. 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (13): 7396–7401.
- Marcili, A., Lima, L., Valente, V. C., Valente, S. A., Batista, J. S., Junqueira, A. C., Souza, A. I., da Rosa, J. A., Campaner, M., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Miles, M. A. and Teixeira, M. M. 2009. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TcIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary genetics in infectious Diseases* 9 (6): 1265–1274.
- Marin-Neto, J. A., Rassi Jr, A., Avezum Jr, A., Mattos, A. C. and Rassi, A. 2009. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (Suppl. D): 319–324.
- Maslov, D. A., Podlipaev, S. A. and Lukes, J. 2001. Phylogeny of the kinetoplastida: Taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 397–402.
- Mejía-Jaramillo, A. M., Peña, V. H. and Triana-Chávez, O. 2009. *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of lineages I and II supports the predominance of lineage I in Colombia. *Experimental Parasitology* 121 (1): 83–91.

- Mendonça, M. B., Nehme, N. S., Santos, S. S., Cupolillo, E., Vargas, N., Junqueira, A., Naiff, R. D., Barrett, T. V., Coura, J. R., Zingales, B. and Fernandes, O. 2001. Two main clusters with *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology* 124: 177–184.
- Miles, M. A., Toye, P. J., Oswald, S. C. and Godfrey, D. G. 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 71: 217–225.
- Miles, M. A., Feliciangeli, M. D. and de Arias, A. R. 2003. American tripanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ (Clinical research ed.)* 326 (7404): 1444–1448.
- Miles, M. A. 2009. American Trypanosomiasis (Chagas' disease). En: *Manson's Tropical Diseases. Protozoan Infections* (G.C. Cook y A.I. Zumla, eds) pp. 1327–1339. Saunders Elsevier Limited.
- Miles, M. A., Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., Gaunt, M. W. and Mauricio, I. L. 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of the *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology* 136 (12): 1509–1528.
- Minter-Goedbloed, E. and Croon, J. J. 1981. The susceptibility of chickens to *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75 (3): 350–353.
- Minch, E., Ruiz-Linares, A., Goldstein, D., Feldman, M. and Cavalli-Sforza, L. 1995. *MICROSAT- The microsatellite Distance Program*. Stanford University Press.
- Moncayo, A. and Silveira, A. C. 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (Suppl. I): 17–30.
- Montilla, M. M., Guhl, F., Jaramillo, C., Nicholls, S., Barnabe, C., Bosseno, M. F. and Breniere, S. F. 2002. Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae Colombian populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66 (4): 394–400.
- Morel, C., Chiari, E., Camargo, E. P., Mattei, D. M., Romanha, A. J. and Simpson, L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (11): 6810–6814.
- Morrison, L. J., Tweedie, A., Black, A., Pinchbeck, G. L., Christley, R. M., Schoenefeld, A., Hertz-Fowler, C., MacLeod, A., Turner, C. M. and Tait, A. 2009. Discovery of mating in the major African livestock pathogen *Trypanosoma congolense*. *PLoS One* 4(5): e5564.
- Murta, S. M. F. and Romanha, A. J. 1999. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 177–180.
- Noireau, F., Abad-Franch, F., Valente S. A. S., Dias-Lima, A., Lopes C. M., Cunha, V., Valente, V. C., Palomeque, F. S., de Carvalho-Pinto C. J., Sherlock, I., Aguilar, M.,

- Steindel, M., Grisard, E. C. and Jurberg, J. 2002. Trapping tiramtomine in silvatic habitats. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 61–63.
- Noireau, F., Diosque, P., Jansen, A. M. 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its host. *Veterinary Research* 40 (2): 26 doi: 10.1051/vetres/2009009.
- Norman, F. F., Pérez de Ayala, A., Pérez-Molina, J. A., Monge-Maillo, B., Zamarrón, P. and López-Vélez, R. 2010. Neglected Tropical diseases outside the Tropics. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (7): e762.doi:10.1371/journal.pntd.0000762.
- O'Connor, O., Bosseno, M. F., Barnabé, C., Douzery, E. J. and Breniere, S. F. 2007. Genetic clustering of *Trypanosoma curzi* I lineage evidenced by intergenic miniexon gene sequencing. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary genetics in infectious Diseases* 7 (5): 587–593.
- Oliveira, R. P., Broude, N. E., Macedo, A. M., Cantor, C. R., Smith, C. L., Pena and S. D. 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (7): 3776–3780.
- Oliveira, R. P., Melo, A. I., Macedo, A. M., Chiari, E. and Pena, S. D. 1999. The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 65–70.
- OPS/OMS. 1999. Estándares de Trabajo para Bancos de Sangre, Segunda edición
- OPS/OMS. 2004. Va Reunión de la Iniciativa Andina de Control de la Enfermedad de Chagas (IPA).
- Peakall, R. and Smouse, P. E. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.
- Page, R. D. M. and Holmes, E. C. 1998. *Molecular evolution: A phylogenetic approach*. Blackwell Publishing, Sigapore.
- Pennington, P. M., Paiz, C., Grajeda, L. M. and Córdón-Rosales, C. 2009. Short report: concurrent detection of *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in domestic *Triatoma dimidiata* from Guatemala. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 80 (2): 239–241.
- Pinho, A. P., Cupolillo, E., Mangia, R. H., Fernandes, O. and Jansen, A. M. 2000. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94 (5): 509–514.
- Pinto, C. M., Ocaña-Mayorga, S., Lascano, M. S. and Grijalva, M. J. 2006. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. *Journal of Parasitology* 92(6): 1251–1255.
- Ponce, C., Ponce, E., Vinelli, E., Montoya, A., de Aguilar, V., Gonzalez, A., Zingales, B., Rangel-Aldao, R., Levin, M.J., Esfandiari, J., Umezawa, E.S., Luquetti, A.O., da Silveira, J.F. 2005. Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of Chagas' disease by detection of *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies in blood of

- donors and patients in Central America. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (10): 5065–5068.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2): 945–959.
- Rabinovich, J. E., Wisnivesky-Colli, C., Solarz, N. D. and Gurtler, R. E. 1990. Probability of transmission of Chagas disease by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in an endemic area of Santiago del Estero, Argentina. *Bulletin of the World Health Organization* 68 (6): 737–746.
- Rademaker, V., Herrera, H. M., Raffel, T. R., D'Andrea, P. S., Freitas, T. P., Abreu, U. G., Hudson, P. J. and Jansen, A. M. 2009. What is the role of small rodents in the transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae)? A study case in the Brazilian Pantanal. *Acta Tropica* 111 (2): 102–107.
- Ramírez, C. J., Jaramillo, C. A., del Pilar Delgado, M., Pinto, N. A., Aguilera, G. and Guhl, F. 2005. Genetic structure of sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from an endemic zone of Boyaca, Colombia. *Acta Tropica* 93 (1): 23–29.
- Rodríguez, I. B., Botero, A., Mejía-Jaramillo, A. M., Marquez, E. J., Ortiz, S., Solari, A. and Triana-Chávez, O. 2009. Transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* determined by low-stringency single primer polymerase chain reaction and southern blot analyses in four indigenous communities of the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81 (3): 396–403.
- Roellig, D. M., McMillan, K., Ellis, A. E., Vandenberg, J. L., Champagne, D. E., Yabsley and M. J. 2010. Experimental infection of two South American reservoirs with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 137 (6): 959–966.
- Rougeron, V., De Meeus, T., Hide, M., Waleckx, E., Bermudez, H., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Dujardin, J. C., De Doncker, S., Le Ray, D., Ayala, F. J. and Bañuls, A. L. 2009. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (25): 10224–10229.
- Rozas, M., Botto-Mahan, C., Coronado, X., Ortiz, S., Cattán, P. E. and Solari, A. 2007. Coexistence of *Trypanosoma cruzi* genotypes in wild and peridomestic mammals in Chile. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77 (4): 647–653.
- Richer, W., Kengne, P., Cortez, M. R., Perrineau, M. M., Cohuet, A., Fontenille, D. and Noireau, F. 2007. Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in the Bolivian Andes. *Tropical Medicine and International Health* 12 (6): 759–764.
- Schmunis, G. A. 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (Suppl I): 75–85.
- Schofield, C. S., Diotaiuti, L. and Dujardin, J. P. 1999. The process of domestication in Triatominae. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 375–378.
- Schofield, C. 2000. *Trypanosoma cruzi* the vector-parasite paradox. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 535–544.

- Schofield, J. C., Jannin, J. and Salvatella, R. 2006. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology* 22 (12): 583–588.
- Schofield, C. J., Galvao, C. 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica* 110 (2-3): 88–100.
- Smith J. M., Smith, N. H., O'Rourke, M. and Spratt, B. G. 1993. How clonal are bacteria?. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 4384–4388.
- Sosa-Estani, S., Gamboa-León, M. R., Del Cid-Lemus, J., Althabe, F., Alger, J., Almendares, O., Cafferata, M. L., Chippaux, J. P., Dumonteil, E., Gibbons, L., Padilla-Raygoza, N., Schneider, D., Belizán, J. M. and Buekens, P. 2008. Use of a rapid test on umbilical cord blood to screen for *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women in Argentina, Bolivia, Honduras, and Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79 (5): 755–759.
- Sosa-Estani, S., Viotti, R. and Segura, E. L. 2009. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (Suppl. I): 167–180.
- Souto, R. P., Fernandes, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A. and Zingales, B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 83 (2): 141–152.
- Souto, R. P. and Zingales, B. 1993. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology* 62 (1): 45–52.
- Stolf, B. S., Souto, R. P., Pedroso, A. and Zingales, B. 2003. Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. *Molecular and Biochemical Parasitology* 126: 73–80.
- Sturm, N. R., Vargas, N. S., Westenberger, S. J., Zingales, B. and Campbell, D. A. 2003. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology* 33 (3): 269–279.
- Suarez-Davalos, V., Dangles, O., Villacis, A. G. and Grijalva, M. J. 2010. Microdistribution of sylvatic triatomine populations in central-coastal Ecuador. *Journal of Medical Entomology* 47 (1): 80–88.
- Tarleton, R. L., Reithinger, R., Urbina, J. A., Kitron, U. and Gurtler, R. E. 2007. The challenges of Chagas Disease—grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Medicine* 4 (12): e332.
- Thomas, M. E., Rasweiler Iv, J. J. and D'Alessandro, A. 2007. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (5): 559–565.
- Tibayrec, M. and Ayala, F. J. 2002. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends in Parasitology* 18 (9): 405–410.

- Tibayrenc, M. 2003. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Unit) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biology and Disease* 2 (1): 12
<http://www.kinetoplastids.com/content/2/1/12>.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F. and Ayala, F. J. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (7): 2414–2418.
- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., and Ayala, F. J. 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 115–119.
- Tirira, D. 2007. Guía de campo de los mamíferos del Ecuador. Ediciones Murciélago Blanco. Publicación especial sobre los mamíferos del Ecuador 6. Quito, Ecuador.
- Traviezo-Valles, L. E., Berkefeld, D. and Aldana, E. 2008. Infección natural de *Panstrongylus rufotuberculatus* (Hemiptera: Reduviidae) al sureste del estado Lara, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental XLVII* (1): 99–102.
- Urdaneta-Morales, S. and Tejero, F. 1992. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920): observations upon pleomorphism. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 87 (4): 511–516.
- Vallejo G. A, Guhl F., Chiari E. and Macedo A. M. 1999. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian host by polymerase chain reaction amplification of kinetoplastid minicircle DNA. *Acta Tropica* 72: 203–212.
- Vallejo, G. A., Guhl, F. and Schaub, G. A. 2009. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Tropica* 110 (2-3): 137–147.
- Vazquez-Prokopek, G. M., Cecere, M. C., Canale, D. M., Gurtler, R. E. and Kitron, U. 2005. Spatiotemporal patterns of reinfestation by *Triatoma guasayana* (Hemiptera:Reduviidae) in a rural community of northeastern Argentina. *Journal of Medical Entomology* 42 (4):571–581.
- Villacís, A. G, Arcos-Terán, L. and Grijalva, M. J. 2008. Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León 1958) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 103 (7): 690–695.
- Weatherly, D. B., Boehkle, C. and Tarleton, R. L. 2009. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics* 10: 255.
- Westenberger, S. J., Barnabé, C., Campbell, D. A., Sturm, N. R. 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171 (2): 527–543.
- WHO-World Health Organization Expert Committee. 2002. Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series 905. Brasilia, Brazil.

- TDR/WHO. 2007. Reporte sobre la Enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas del 17-20 de abril 2005; actualizado en Julio 2007. Edits Guhl, F., Lazdins-Helds, J.K. Buenos Aires, Argentina.
- Xavier, S. C., Vaz, V. C., D'Andrea, P. S., Herrea, L., Emperaire, L., Alves, J. R., Fernandes, O., Ferreira, L. F. and Jansen, A. M. 2007. Mapping of the distribution of *Trypanosoma cruzi* infection among small wild mammals in a conservation unit and its surroundings (Northeast-Brazil). *Parasitology International* 56 (2): 119–128.
- Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M. S., Sánchez, H., Adamson, S., Miles, G. A., López, E., González, N., Patterson, J. S., Gaunt, M. W., de Arias, A. R. and Miles, M. A. 2005. Origins of Chagas Disease: *Didelphis* species are natural host of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos host of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International Journal for Parasitology* 35 (2): 225–233.
- Zeledon, R. 1974. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. En: *Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease*. Ciba Foundation Symposium 20. pp. 51–85. New York, USA.
- Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Sturm, N. R., Tibayrenc, M. and Schijman, A. G. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (7): 1051–1054.

9. FIGURAS

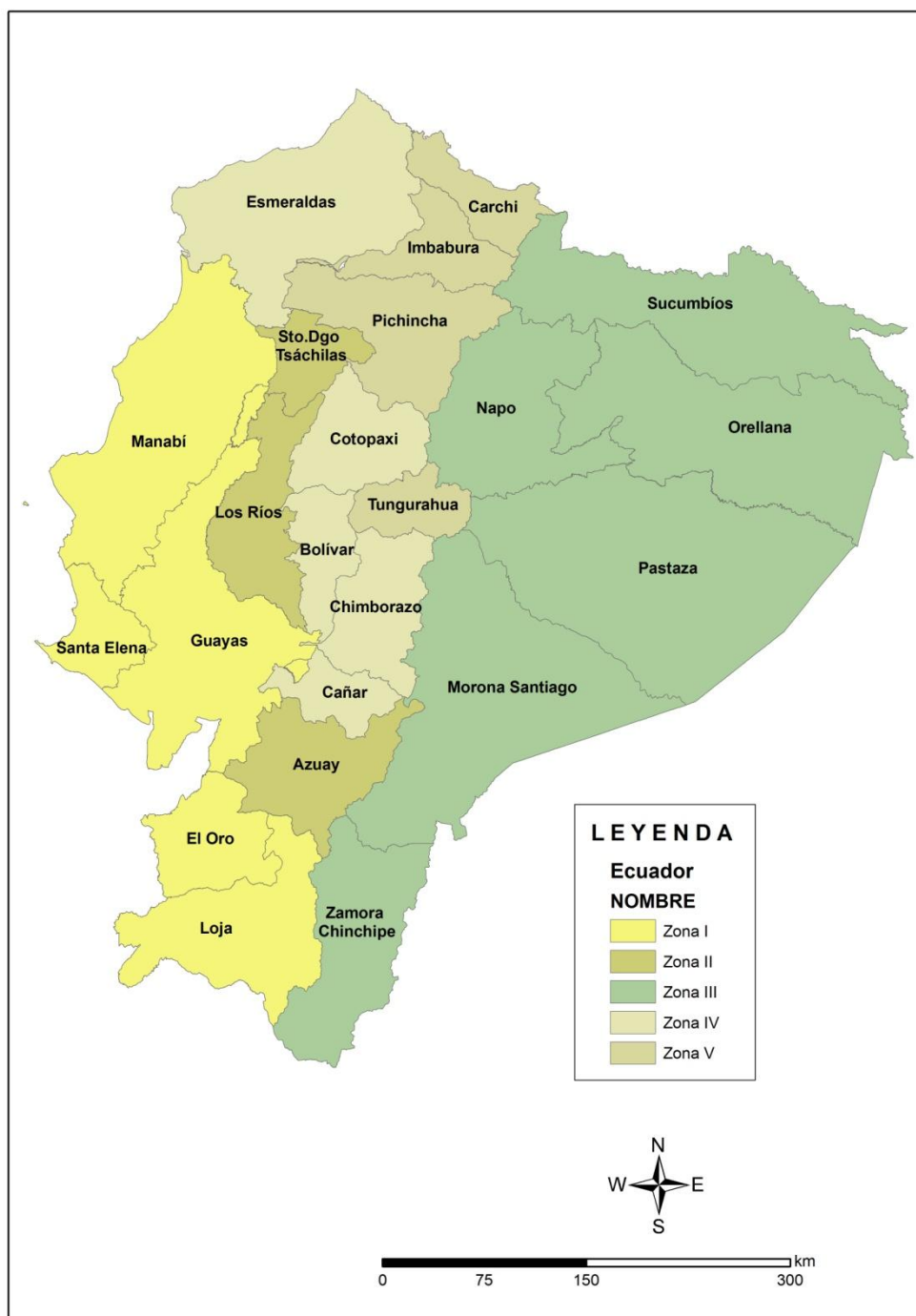


Figura 1. Mapa de riesgo de transmisión de la Enfermedad de Chagas en Ecuador. El mapa muestra la división política actual del país con la zonificación propuesta por Abad-Franch y Aguilar, 2003. Se proponen 5 zonas de riesgo, en forma descendente, siendo la zona I la que presenta mayor riesgo de transmisión.

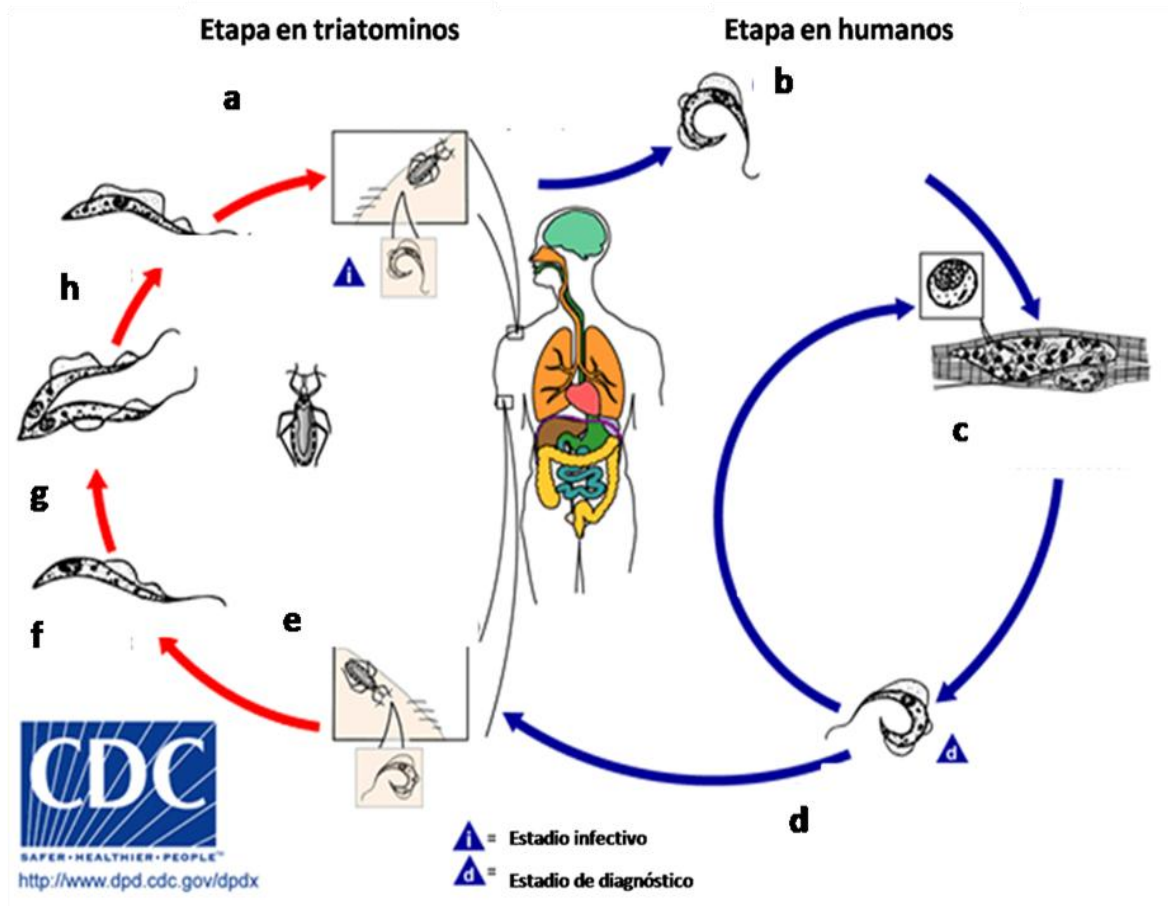


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. El parásito pasa por etapas de desarrollo tanto en el triatomo como en el humano: a) El triatomo se alimenta de sangre y transmite los tripomastigotes metacíclicos a través de las heces. Los tripomastigotes entran a torrente sanguíneo por la herida de la picadura o por membranas mucosas. b) Los tripomastigotes metacíclicos entran en las células y se transforman en amastigotes. c) Los amastigotes se multiplican por fisión binaria. d) Los amastigotes intracelulares se transforman en tripomastigotes sanguíneos que son liberados en el torrente sanguíneo. Algunos tripomastigotes infectan otras células, mientras que otros e) serán ingeridos por los triatominos en el momento de la alimentación. f) En el intestino medio del vector, los parásitos se transforman en epimastigotes y g) se multiplican. h) En el intestino posterior, los parásitos se transforman a tripomastigotes metacíclicos, el estadio infeccioso de *T. cruzi*. Modificado del CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (<http://www.dpd.cdc.gov/DPDX/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>).



Figura 3. Colección de triatominos en el campo. Búsqueda de triatominos en los hábitat domiciliar, peridomiciliar y proceso de rociamiento (a–c); búsquedas selváticas (d) y análisis de triatominos en laboratorio de campo (e,f). Fotos: archivo CIEI.



Figura 4. Colección de mamíferos en el campo. Proceso de captura de mamíferos con trampas Tomahawk (a) y Sherman (b). En hábitat peridomiciliar son comunes las raposas *D. marsupialis* (c), mientras que en el ambiente silvestre son importantes las ardillas *S. stramineus* (d). Procesamiento de mamíferos en laboratorio (e y f). Fotos: archivo CIEI.

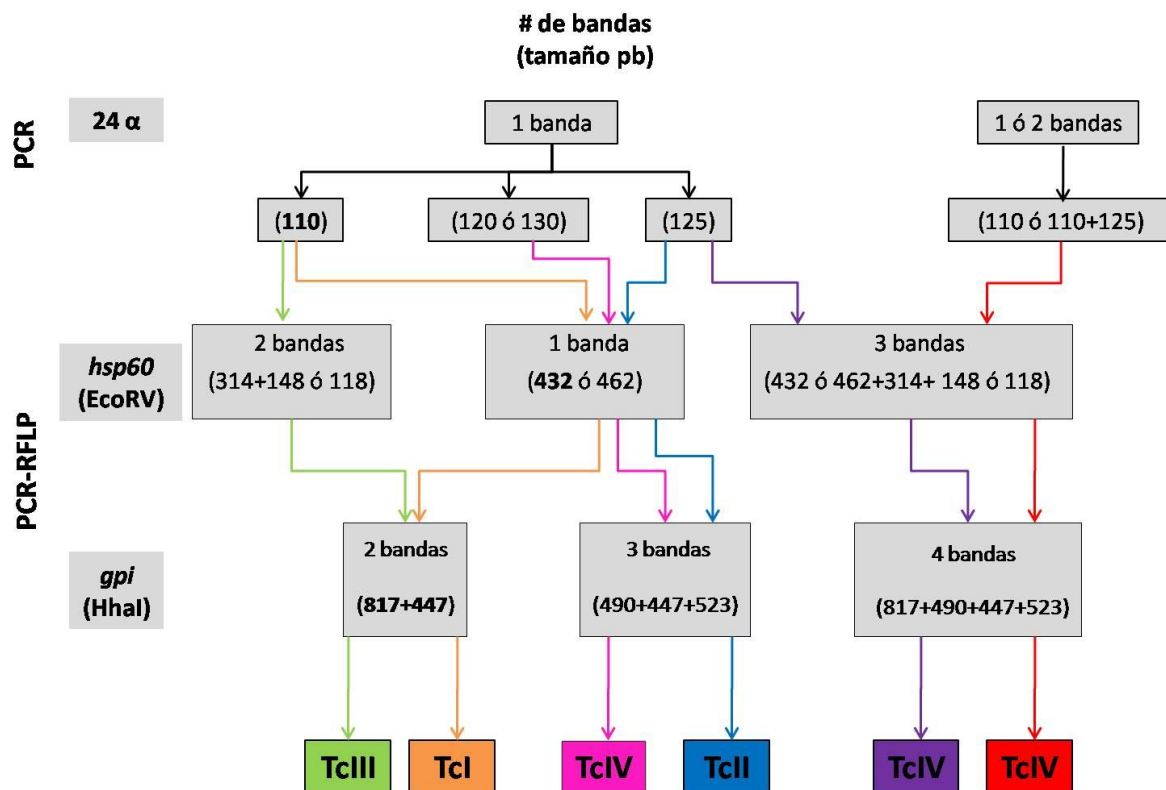


Figura 5. Esquema para caracterización de linajes de *T. cruzi*. Tamaño de bandas esperadas para la amplificación del gen 24S α y los productos de digestión esperados con las enzimas de restricción aplicadas a los genes *hsp60*, *gpi* para discriminar los 6 DTUs. Modificado de Lewis *et al.*, 2009 en base a la nueva nomenclatura (Zingales *et al.*, 2009). En negrillas los tamaños de bandas obtenidas de los fragmentos de amplificación (24S α) y restricción (*hsp60*, *gpi*) de las muestras ecuatorianas, correspondientes al linaje TcI.

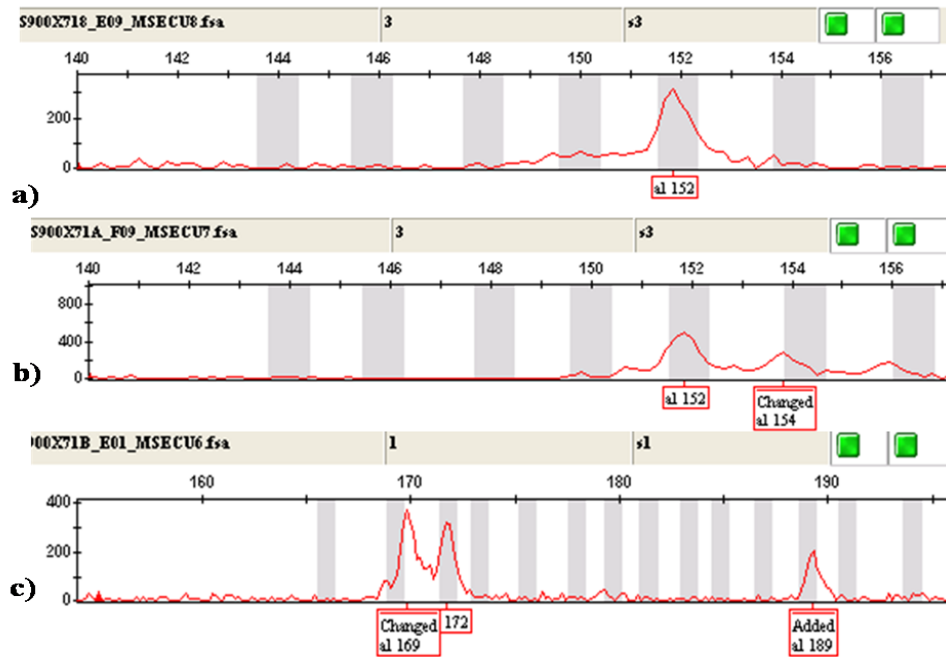


Figura 6. Perfiles de amplificación de dos loci de microsatélites. Espectrofluorogramas para determinar los tamaños de alelos. La figura a y b corresponden a un mismo locus que presenta el perfil esperado en muestras diploides a) homocigoto, b) heterocigoto. La figura c corresponde a una muestra que presenta multiclonalidad en un locus y se observa la presencia de 3 alelos.

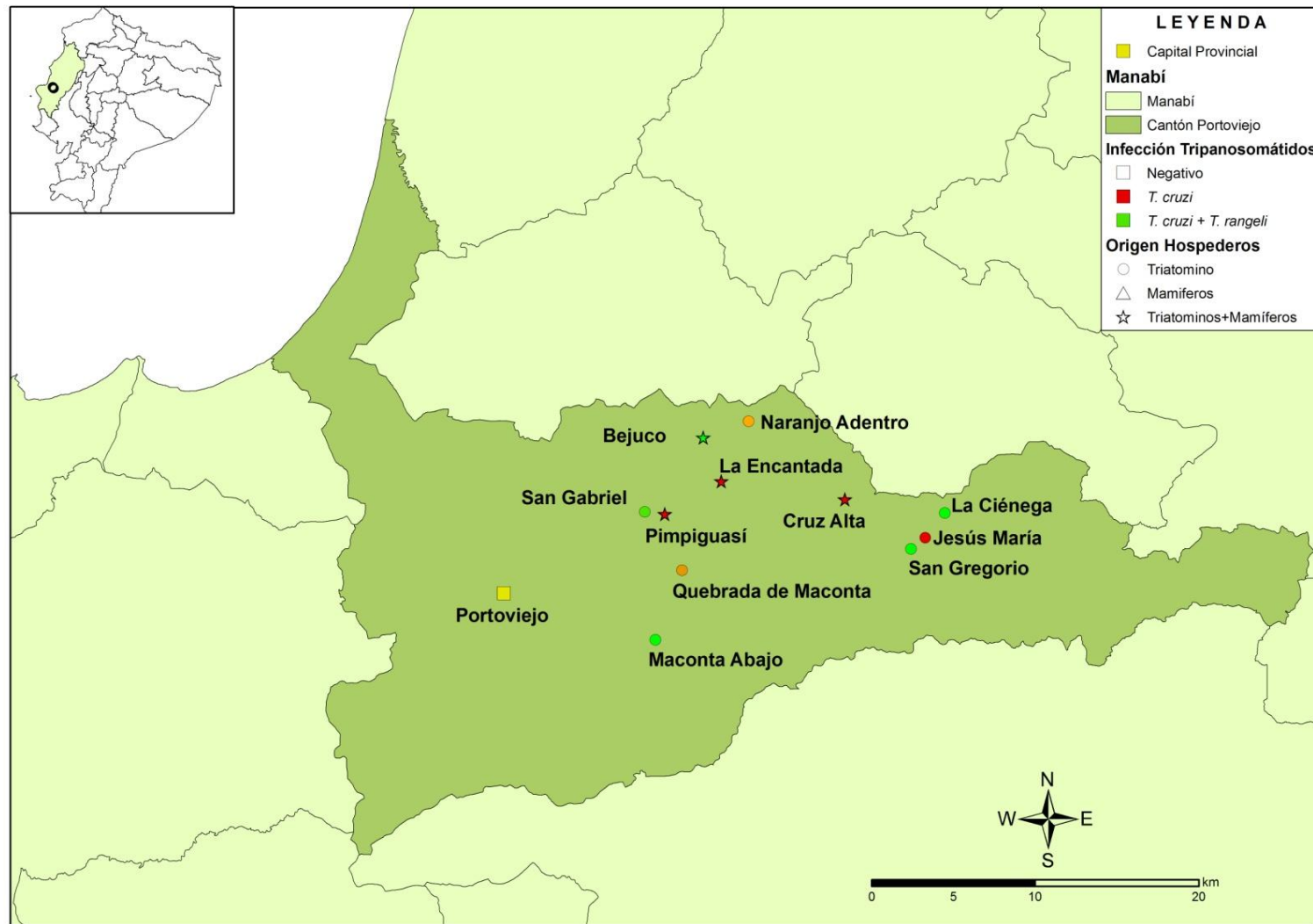


Figura 7. Distribución de *T. cruzi* y *T. rangeli* en hospederos de la provincia de Manabí. El mapa muestra la ubicación de las 11 comunidades, en el cantón Portoviejo, de donde se obtuvo aislados de *T. cruzi* y *T. rangeli* de triatominos y mamíferos. Mapa: C. Yumiseva (CIEI).

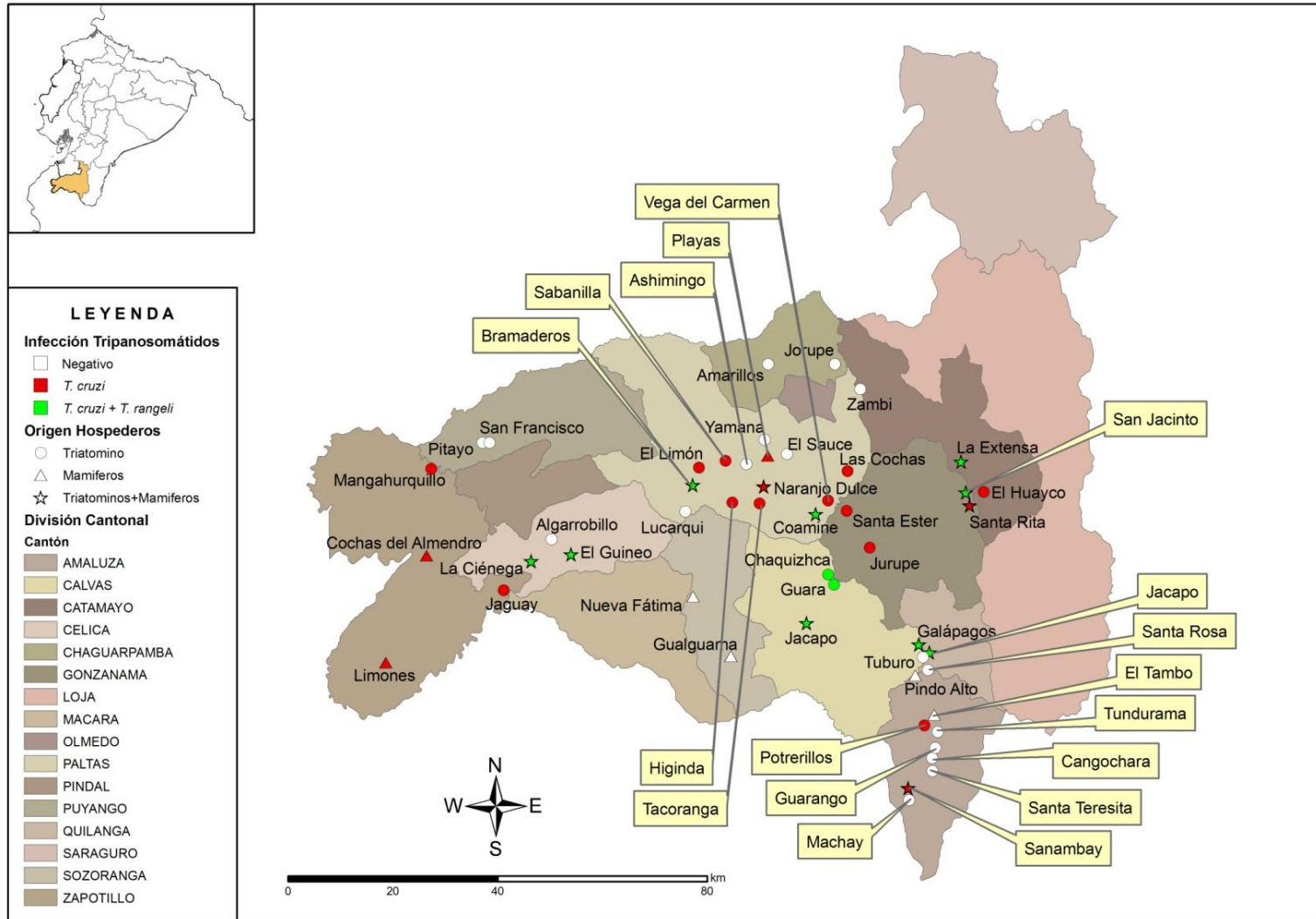


Figura 8. Distribución de *T. cruzi* y *T. rangeli* en hospederos de la provincia de Loja. El mapa muestra la ubicación de las 51 comunidades, en 11 cantones, de donde se obtuvo aislados de *T. cruzi* y/o *T. rangeli*. Mapa: C. Yumiseva (CIEI).

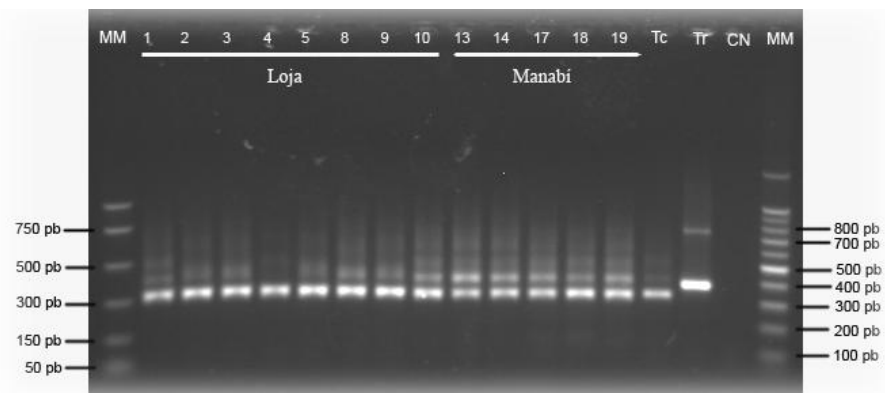


Figura 9. Detección de la infección con *T. cruzi* y *T. rangeli* mediante kDNA (S35/S36) en aislados de triatomíneos y mamíferos de los hábitat de domicilio y peridomicilio en Loja y Manabí. MM, marcadores de peso molecular, 1, TRT672 (*P. chinai*, domicilio); 2, TJU034 (*T. carrioni*, domicilio); 3, TBR123 (*R. ecuadoriensis*, domicilio); 4, TSA170 (*R. ecuadoriensis*, peridomicilio); 5, TGL0004 (*R. ecuadoriensis*, peridomicilio); 8, MCG1232 (*R. rattus*, domicilio); 9, MCE1126 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 10, MSJ1147 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 13, TBJ420 (*P. howardi*, peridomicilio); 14, TNG545 (*R. ecuadoriensis*, peridomicilio); 17, MPI7139 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 18, MPI7148 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 19, MLE7161 (*D. marsupialis*, peridomicilio); Tc: control positivo *T. cruzi*; Tr: control positivo *T. rangeli*; CN: control negativo.

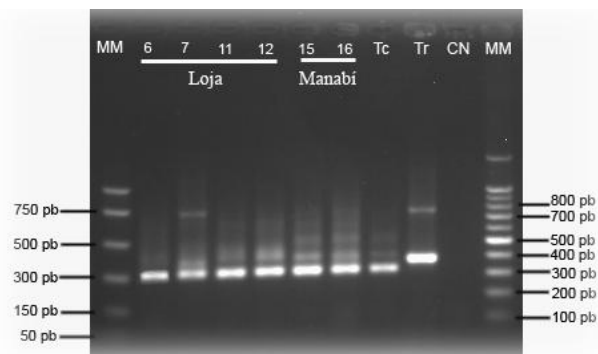


Figura 10. Detección de la infección con *T. cruzi* y *T. rangeli* mediante kDNA (S35/S36) en aislados de triatomíneos y mamíferos de los hábitat silvestre en Loja y Manabí. MM, marcadores de peso molecular; 6, TCG1031 (*R. ecuadoriensis*); 7, TGL031 (*R. ecuadoriensis*); 11, MBR1329 (*D. marsupialis*); 12, MBR1349 (*S. stramineus*); 15, TMB565 (*R. ecuadoriensis*); 16, TMB572 (*R. ecuadoriensis*); Tc, control positivo *T. cruzi*; Tr: control positivo *T. rangeli*; CN: control negativo.

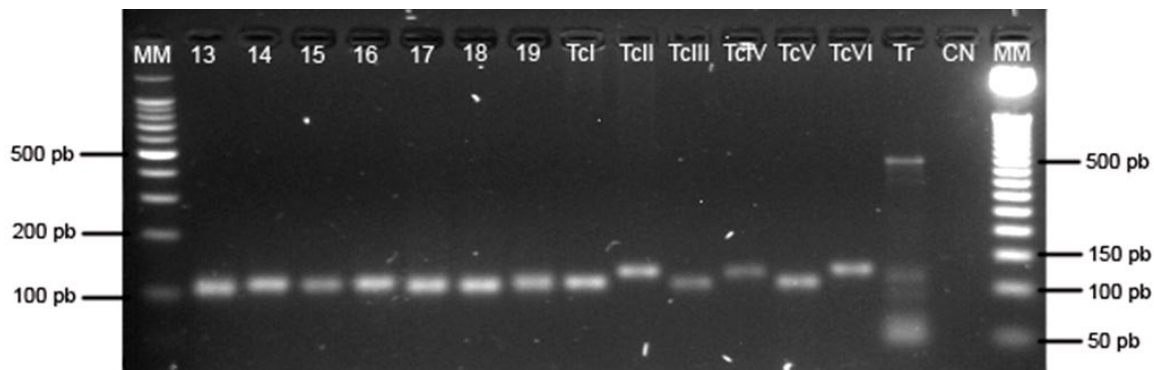


Figura 11. Amplificación del gen 24S α de rARN (D71/D72) de *T. cruzi* aislados de muestras de triatominos y mamíferos en los hábitat de peridomicilio y silvestre de Manabí. MM, marcadores de peso molecular; 13, TBJ420 (*P. howardi*, peridomicilio); 14, TNG545 (*R. ecuadoriensis*, peridomicilio); 15, TMB565 (*R. ecuadoriensis*, silvestre); 16, TMB572 (*R. ecuadoriensis*, silvestre); 17, MPI7139 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 18, MPI7148 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 19, MLE7161 (*D. marsupialis*, peridomicilio). Controles, TcI (X10/1); TcII (ESMCI3); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII); TcV (SC43 cl1); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.

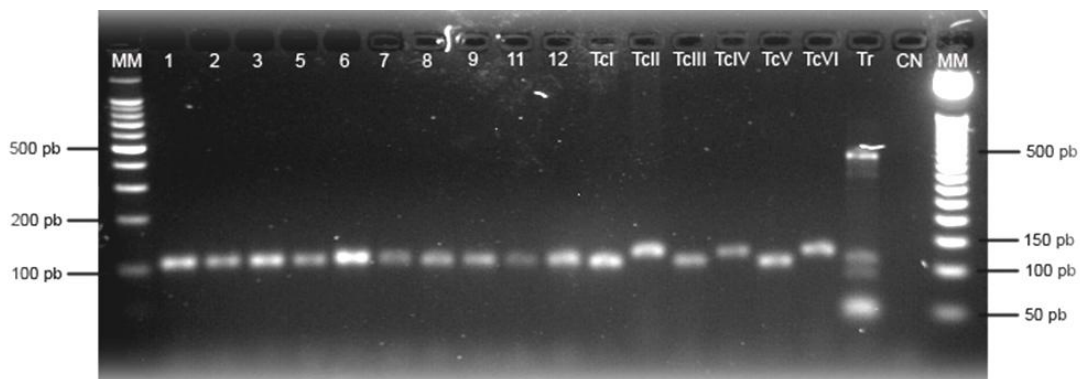


Figura 12. Amplificación del gen 24S α de rARN (D71/D72) de *T. cruzi* aislados de muestras de triatominos y mamíferos en los hábitat de domicilio, peridomicilio y silvestre de Loja. MM, marcadores de peso molecular; 1, TRT672 (*P. chinai*, domicilio); 2, TJU034 (*T. carrioni*, domicilio); 3, TBR123 (*R. ecuadoriensis*, domicilio); 5, TGL0004 (*R. ecuadoriensis*, peridomicilio); 6, TCG1031 (*R. ecuadoriensis*, silvestre); 7, TGL031 (*R. ecuadoriensis*, silvestre); 8, MCG1232 (*R. rattus*, domicilio); 9, MCE1126 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 11, MBR1329 (*D. marsupialis*, silvestre); 12, MBR1349 (*S. stramineus*, silvestre). Controles, TcI (X10/1); TcII (ESMCI3); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII); TcV (SC43 cl1); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.

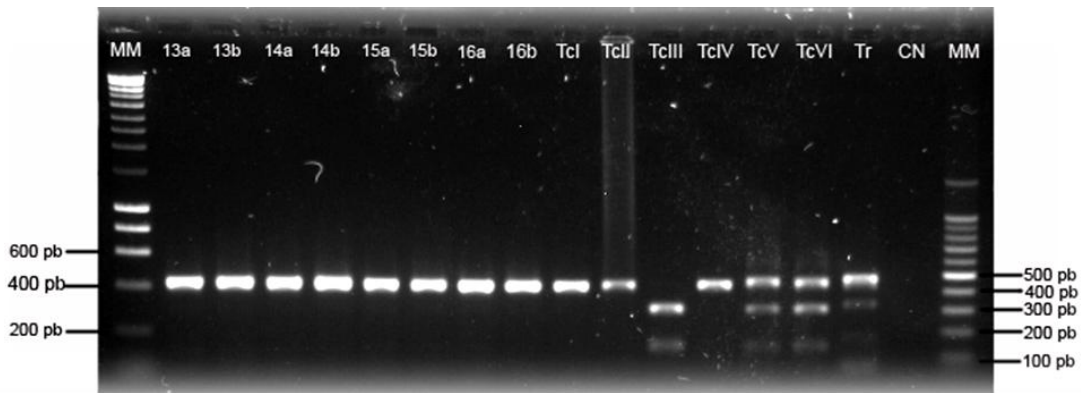


Figura 13. Amplificación del gen *hsp60* y los productos de restricción con la enzima *EcoRV* para determinación del linaje de *T. cruzi* de aislados de triatominos colectados en hábitat peridomiciliar y silvestre en Manabí. a, producto de amplificación; b, productos de restricción. MM, marcadores de peso molecular; 13, TBJ420 (*P. howardi*, peridomicilio); 14, TNG545 (*R. ecuadoriensis*, peridomicilio); 15, TMB565 (*R. ecuadoriensis*, silvestre); 16, TMB572 (*R. ecuadoriensis*, silvestre). Controles, TcI (X10/1); TcII (ESMC13); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII); TcV (SC43 c11); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.

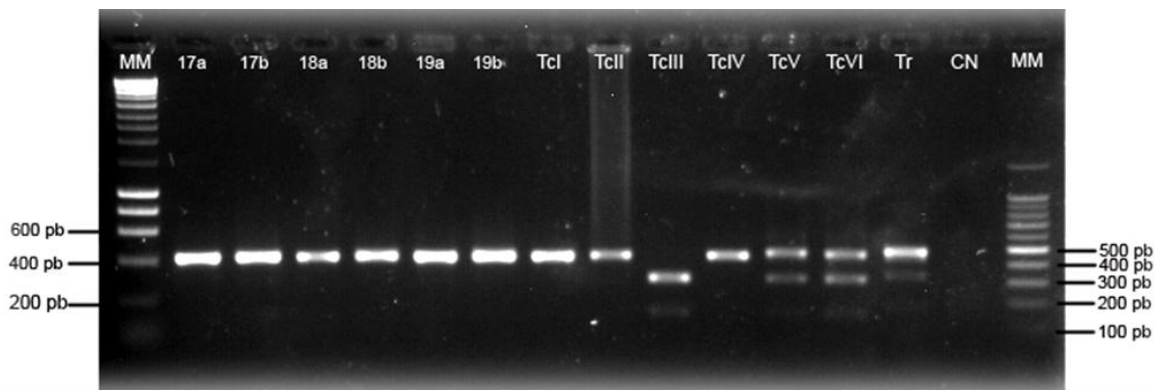


Figura 14. Amplificación del gen *hsp60* y los productos de restricción con la enzima *EcoRV* para determinación del linaje de *T. cruzi* de aislados de mamíferos colectados en hábitat peridomiciliar en Manabí. a, producto de amplificación; b, productos de restricción. MM, marcadores de peso molecular; 17, MPI7139 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 18, MPI7148 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 19, MLE7161 (*D. marsupialis*, peridomicilio). Controles, TcI (X10/1); TcII (ESMC13); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII); TcV (SC43 c11); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.

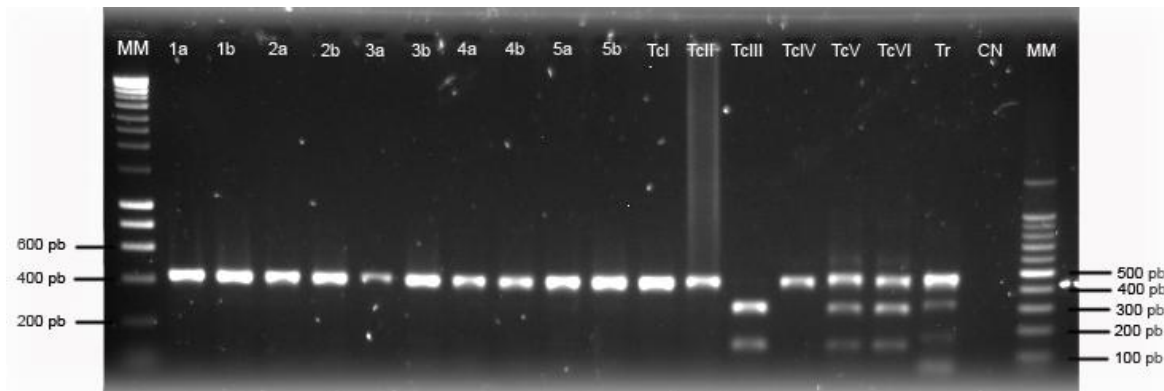


Figura 15. Amplificación del gen *hsp60* y los productos de restricción con la enzima *EcoRV* para determinación del linaje de *T. cruzi* de aislados de triatominos colectados en hábitat domiciliar y peridomiciliar en Loja. a, producto de amplificación; b, productos de restricción. MM, marcadores de peso molecular; 1, TRT672 (*P. chinai*, domicilio); 2, TJU034 (*T. carrioni*, domicilio); 3, TBR123 (*R. ecuadoriensis*, domicilio); 4, TSA170 (*R. ecuadoriensis*, peridomicilio); 5, TGL0004 (*R. ecuadoriensis*, peridomicilio). Controles, TcI (X10/1); TcII (ESMC13); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII); TcV (SC43 cl1); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.

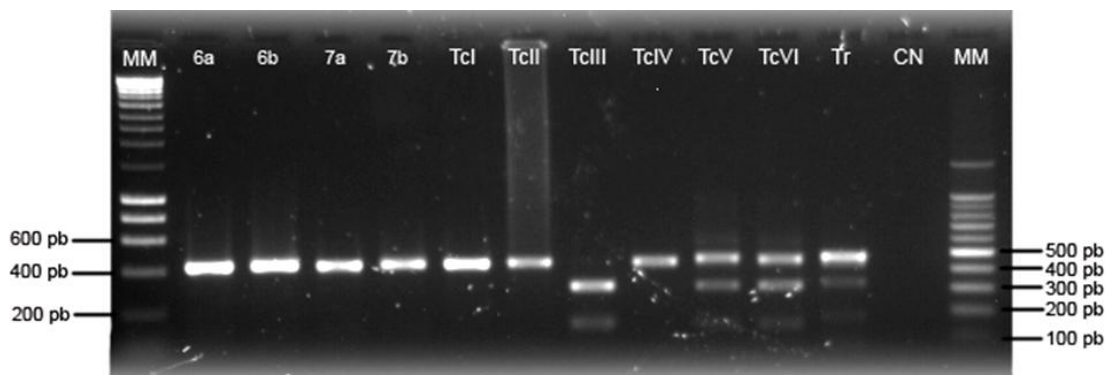


Figura 16. Amplificación del gen *hsp60* y los productos de restricción con la enzima *EcoRV* para determinación del linaje de *T. cruzi* de aislados de triatominos colectados en hábitat silvestre en Loja. a, producto de amplificación; b, productos de restricción. MM, marcadores de peso molecular; 6, TCG1031 (*R. ecuadoriensis*); 7, TGL031 (*R. ecuadoriensis*). Controles, TcI (X10/1); TcII (ESMC13); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII); TcV (SC43 cl1); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.

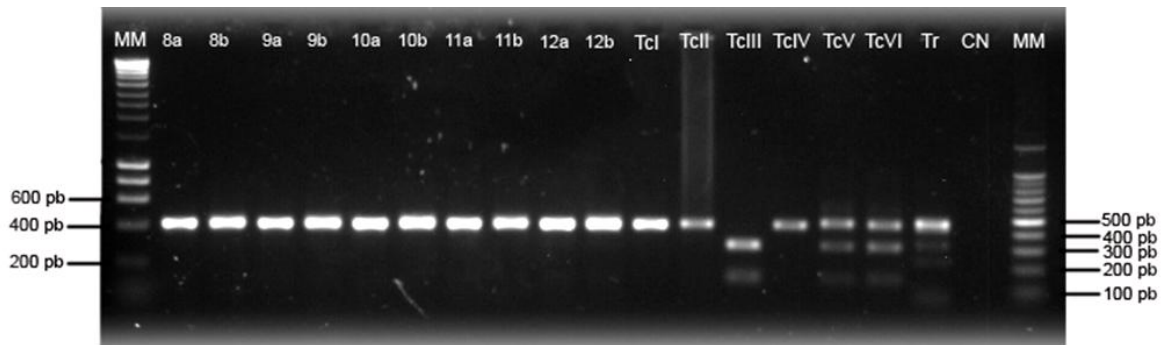


Figura 17. Amplificación del gen *hsp60* y los productos de restricción con la enzima *EcoRV* para determinación del linaje de *T. cruzi* de aislados de mamíferos colectados en hábitat domiciliar, peridomiciliar y silvestre en Loja. a, producto de amplificación; b, productos de restricción. MM, marcadores de peso molecular; 8, MCG1232 (*R. rattus*, domicilio); 9, MCE1126 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 10, MSJ1147 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 11, MBR1329 (*D. marsupialis*, silvestre); 12, MBR1349 (*S. stramineus*, silvestre). Controles, TcI (X10/1); TcII (ESMC13); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII); TcV (SC43 c11); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.

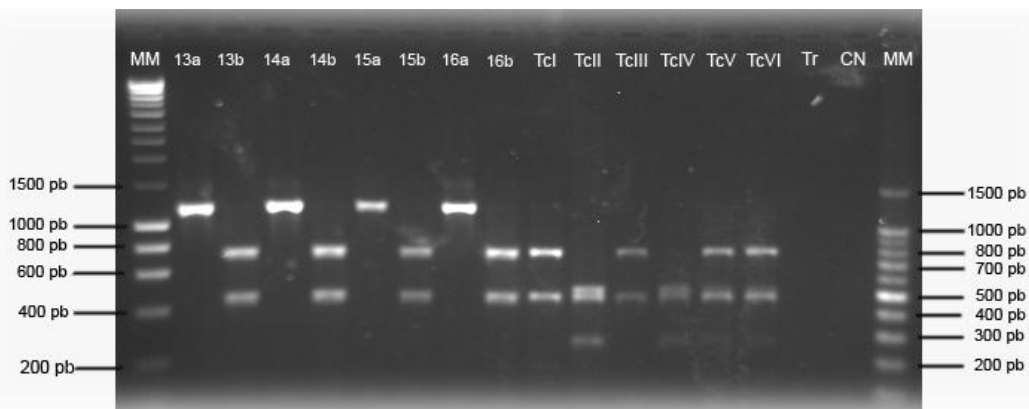


Figura 18. Amplificación del gen *gpi* y los productos de restricción con la enzima *HhaI* para determinación del linaje de *T. cruzi* de aislados de triatomíneos colectados en hábitat peridomiciliar y silvestre en Manabí. a, producto de amplificación; b, productos de restricción. MM, marcadores de peso molecular; 13, TBJ420 (*P. howardi*, peridomicilio); 14, TNG545 (*R. ecuadoriensis*, peridomicilio); 15, TMB565 (*R. ecuadoriensis*, silvestre); 16, TMB572 (*R. ecuadoriensis*, silvestre). Controles, TcI (X10/1); TcII (ESMC13); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII); TcV (SC43 c11); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.

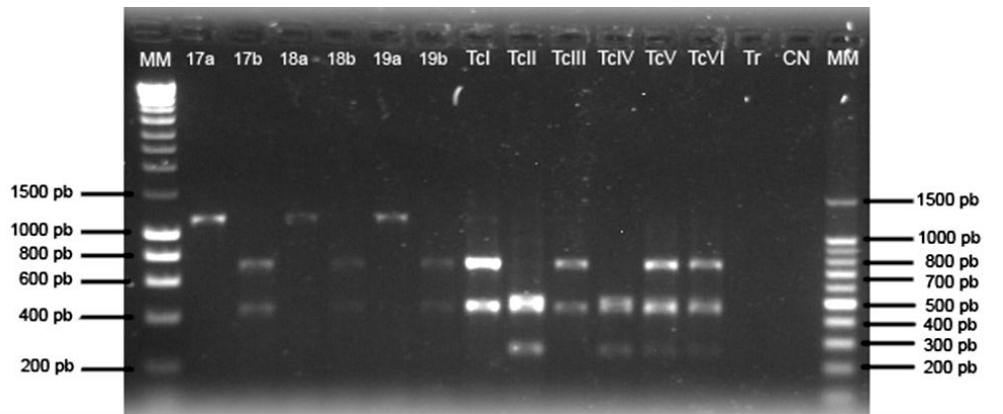


Figura 19. Amplificación del gen *gpi* y los productos de restricción con la enzima *HhaI* para determinación del linaje de *T. cruzi* de aislados de mamíferos colectados en hábitat peridomiciliar en Manabí. a, producto de amplificación; b, productos de restricción. MM, marcadores de peso molecular; 17, MPI7139 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 18, MPI7148 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 19, MLE7161 (*D. marsupialis*, peridomicilio). Controles, TcI (X10/1); TcII (ESMC13); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII); TcV (SC43 cl1); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.

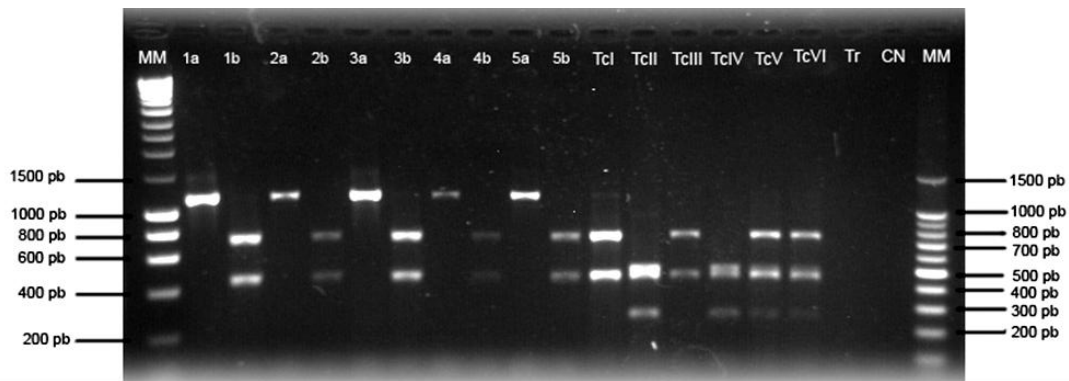


Figura 20. Amplificación del gen *gpi* y los productos de restricción con la enzima *HhaI* para determinación del linaje de *T. cruzi* de aislados de triatomíneos colectados en hábitat domiciliar y peridomiciliar en Loja. a, producto de amplificación; b, productos de restricción. MM, marcadores de peso molecular; 1, TRT672 (*P. chinai*, domicilio); 2, TJU034 (*T. carrioni*, domicilio); 3, TBR123 (*R. ecuadoriensis*, domicilio). Controles, TcI (X10/1); TcII (ESMC13); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII), TcV (SC43 cl1); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.

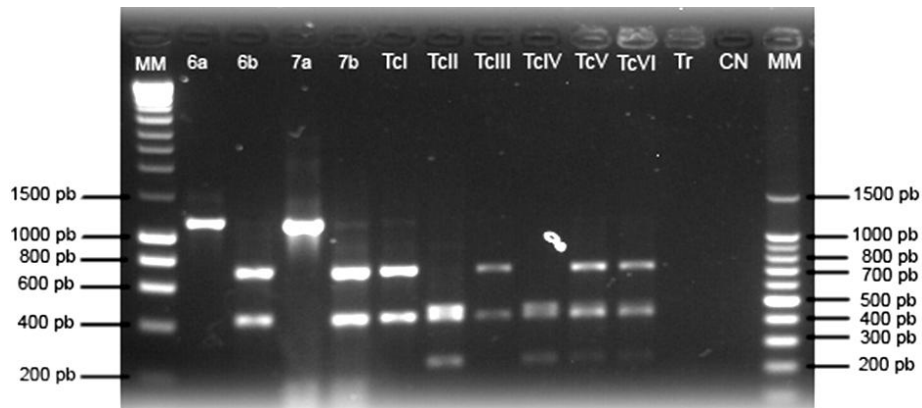


Figura 21. Amplificación del gen *gpi* y los productos de restricción con la enzima *HhaI* para determinación del linaje de *T. cruzi* de aislados de triatomos colectados en hábitat silvestre en Loja. a, producto de amplificación; b, productos de restricción. MM, marcadores de peso molecular; 6, TCG1031 (*R. ecuadoriensis*); 7, TGL031 (*R. ecuadoriensis*). Controles, TcI (X10/1); TcII (ESMC13); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII); TcV (SC43 cl1); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.

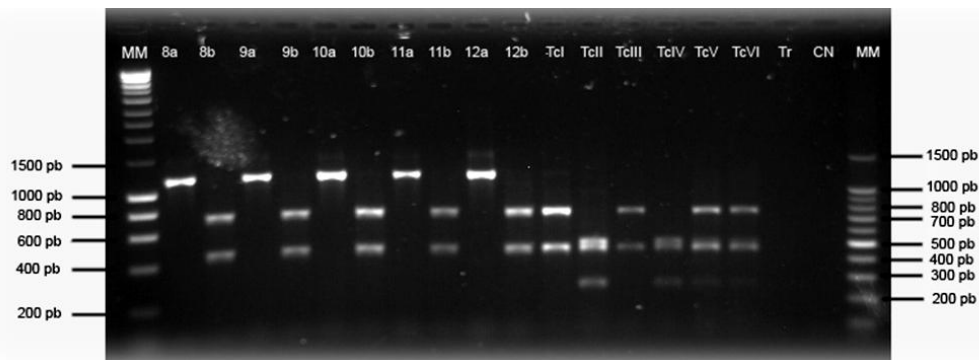


Figura 22. Amplificación del gen *gpi* y los productos de restricción con la enzima *HhaI* para determinación del linaje de *T. cruzi* de aislados de mamíferos colectados en hábitat domiciliar, peridomiciliar y silvestre en Loja. a, producto de amplificación; b, productos de restricción. MM, marcadores de peso molecular; 8, MCG1232 (*R. rattus*, domicilio); 9, MCE1126 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 10, MSJ1147 (*D. marsupialis*, peridomicilio); 11, MBR1329 (*D. marsupialis*, silvestre); 12, MBR1349 (*S. stramineus*, silvestre). Controles, TcI (X10/1); TcII (ESMC13); TcIII (M6241cl6); TcIV (CANIII); TcV (SC43 cl1); TcVI (CL Brener); Tr, *T. rangeli*; CN, control negativo.

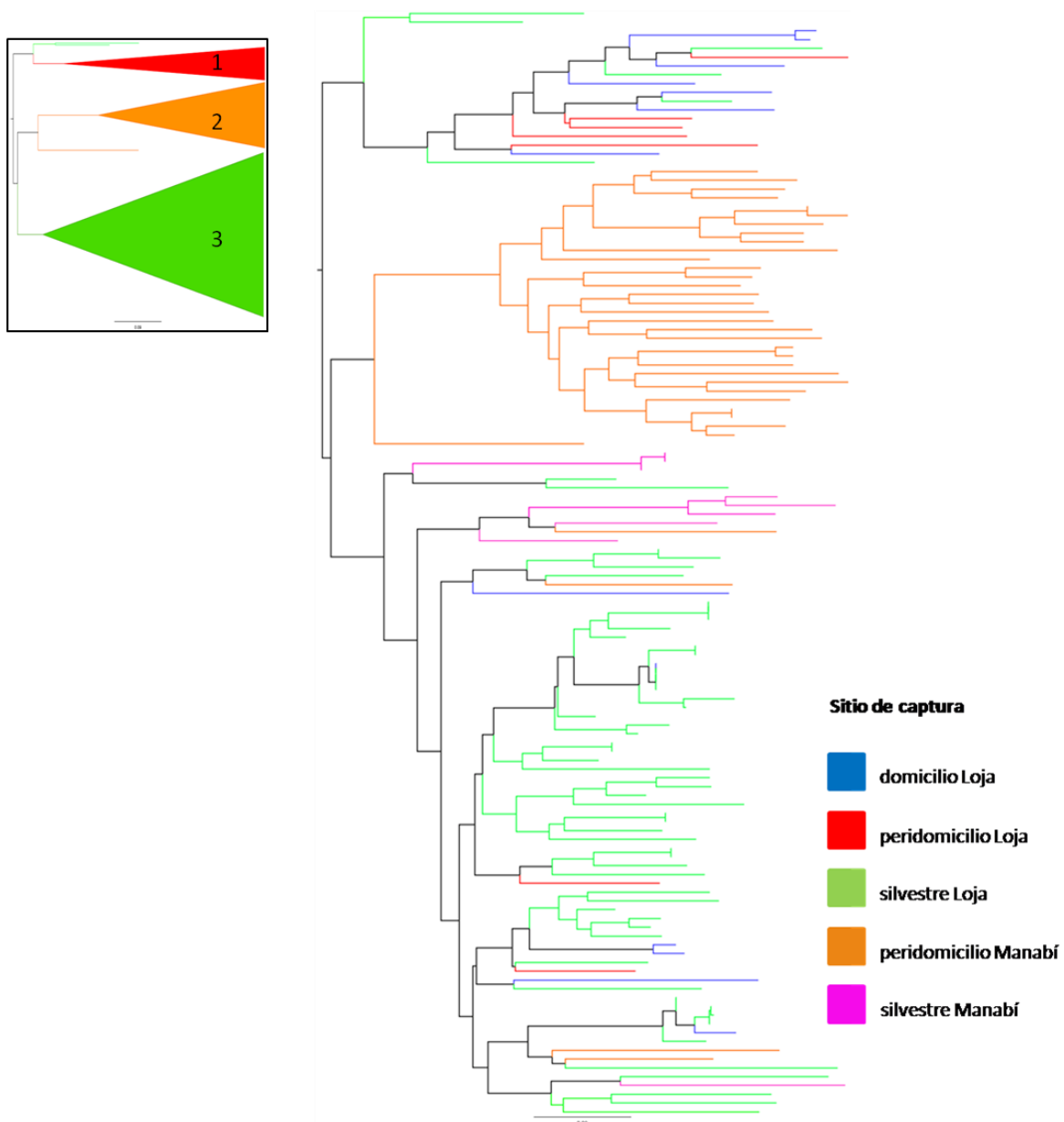


Figura 23. Dendrograma de las poblaciones ecuatorianas (Loja y Manabí). El dendrograma está basado en los valores D_{AS} de 10 loci polimórficos. Se observan tres grupos: 1, formado principalmente por los aislados de domicilio y peridomicilio de Loja; 2, muestras de peridomicilio de Manabí y; 3, muestras selváticas (Loja y Manabí). Tanto la fortaleza de la rama principal (4,7%), como el porcentaje de congruencia (7,7%) es demasiado bajo como para definir la estructura poblacional de las muestras en conjunto.

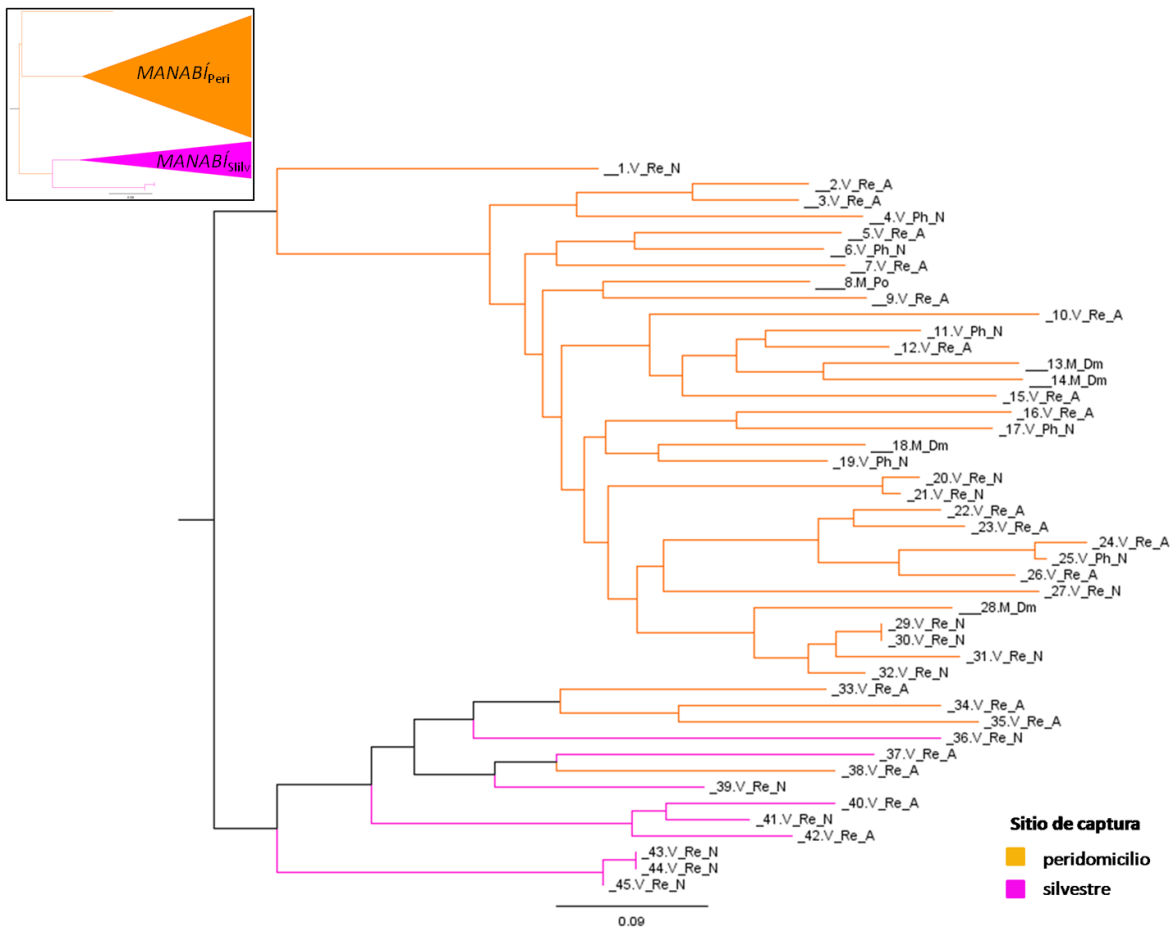


Figura 24. Dendrograma de las poblaciones de Manabí. El dendrograma está basado en los valores D_{AS} de 10 loci polimórficos. Se observa la agrupación de dos poblaciones: 1, $MANABI_{Peri}$ formada por aislados colectados en el hábitat peridomiciliario (anaranjado); 2, $MANABI_{Silv}$ formada por aislados colectados en el hábitat silvestre (rosado). Los códigos de las muestras se definen de la siguiente forma: M (mamífero reservorio); Po (*Phliander opossum*); Dm (*Didelphis marsupialis*); V (vector triatomino); Re (*Rhodnius ecuadoriensis*); Ph (*Panstrongylus howardi*); A (adulto); N (ninfa).

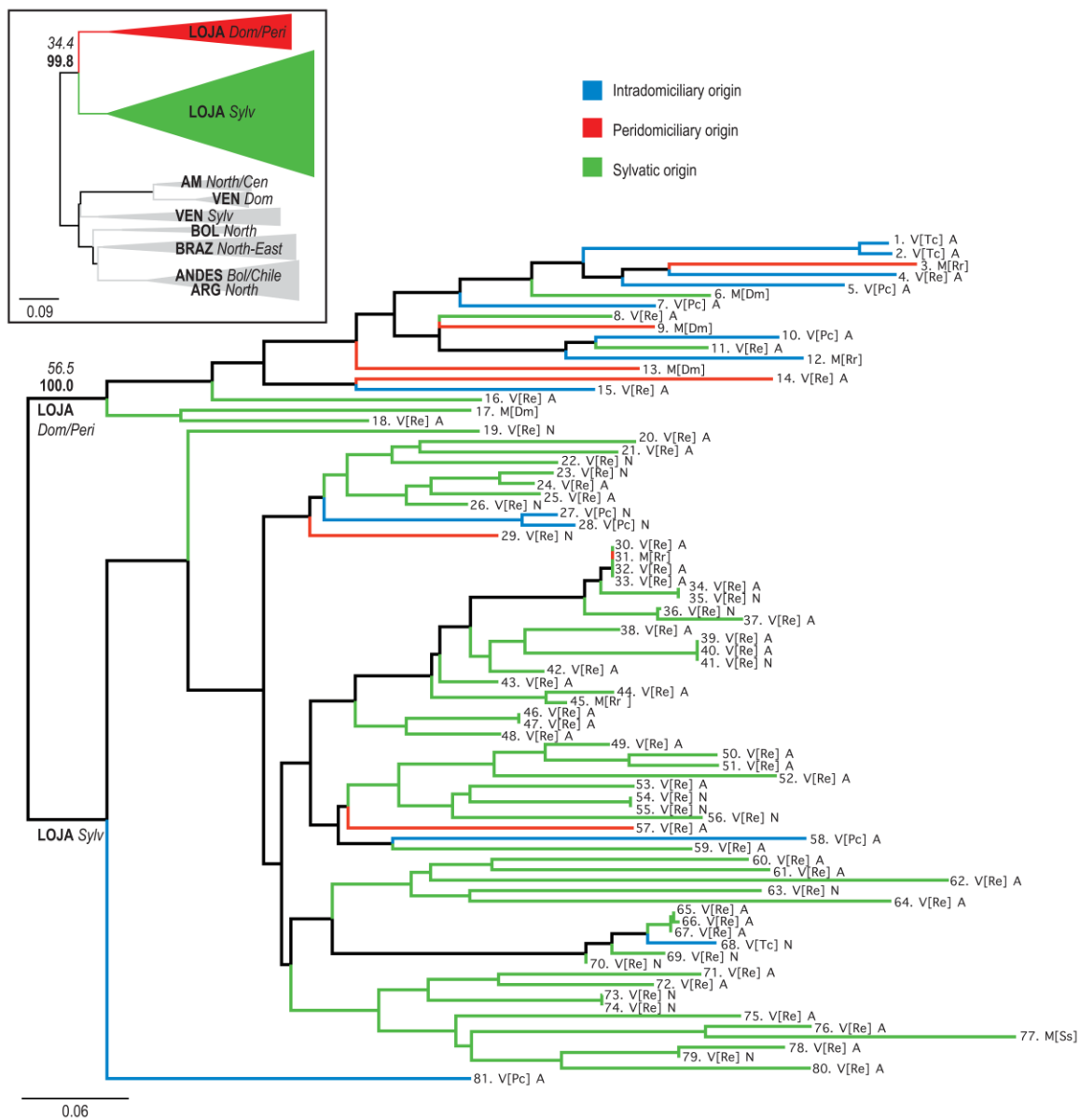


Figura 25. Dendrograma de las poblaciones de Loja. El dendrograma está basado en los valores D_{AS} de 10 loci polimórficos. Se observa la agrupación de dos poblaciones con una fortaleza de 56,5% y una congruencia de 100%: 1, $LOJA_{Dom/Peri}$ formada por aislados colectados en el hábitat peridomiciliar (anaranjado), 2, $LOJA_{Sylv}$ formada por aislados colectados en el hábitat silvestre (rosado). Los códigos de las muestras se definen de la siguiente forma: el hospedero se define como M (mamífero reservorio) y V (vector triatomino), seguido de una abreviación de la especie, Dm (*Didelphis marsupialis*), Rr (*Rattus rattus*), Ss (*Sciurus stramineus*), Re (*Rhodnius ecuadoriensis*), Pc (*Panstrongylus chinai*), Tc (*Triatoma carrioni*), y el estadio del triatomino, A (adulto), N (ninfa). En el inserto superior se observa la separación de los aislados de Loja en relación a aislados de TcI de otras regiones de América. Edición figura: D. Pratt, OU.

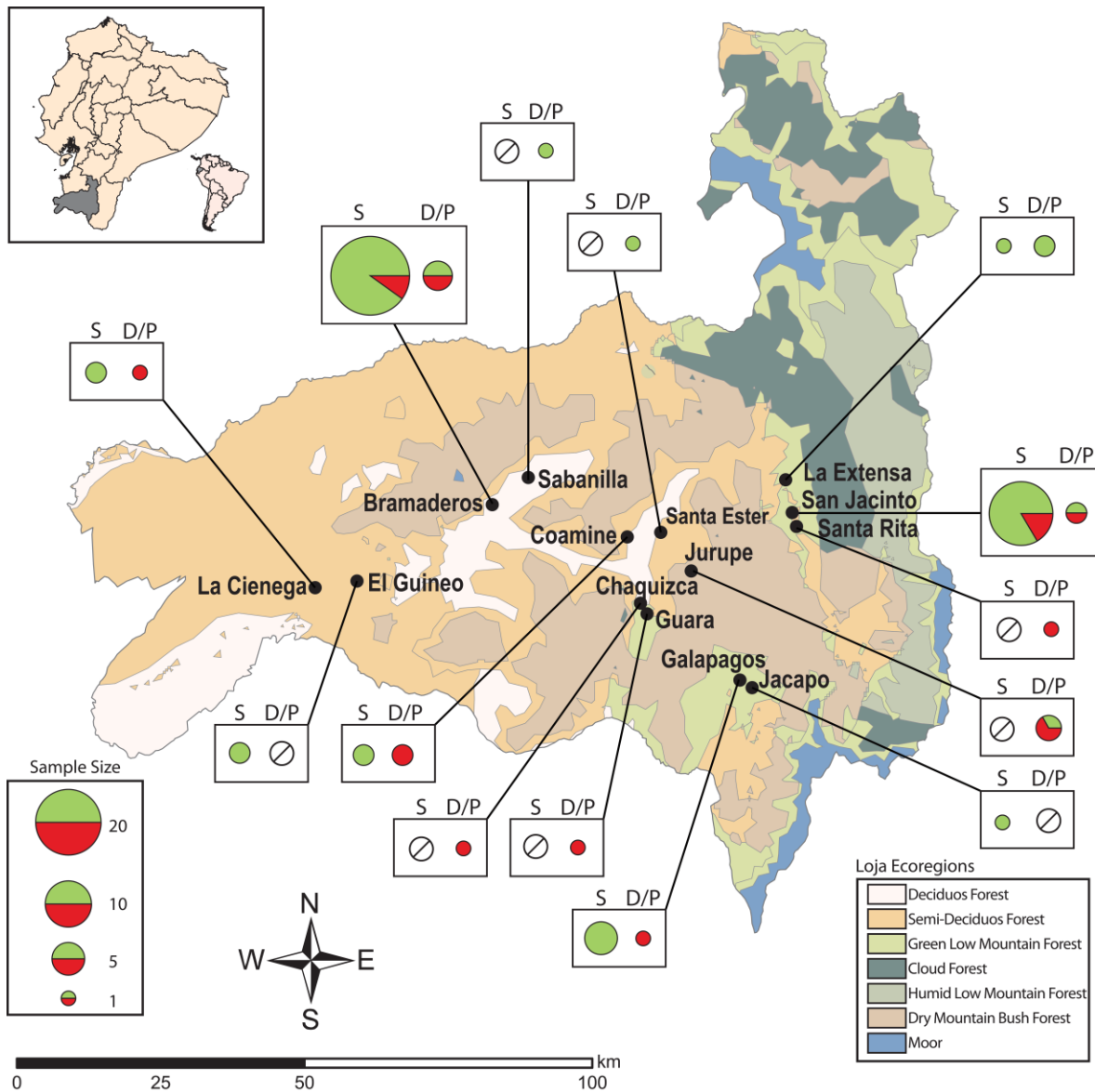


Figura 26. Distribución de genotipos en relación al hábitat de captura en Loja. El mapa muestra las localidades donde se aislaron las muestras incluidas en los análisis de los 10 microsatélites polimórficos y el flujo genético entre los ambientes domiciliar/peridomiciliar y silvestre. Los pies (S) corresponden a muestras colectadas en hábitat silvestre y (D/P) a muestras colectadas en hábitat de domicilio y peridomicilio. El color verde representa la proporción de muestras de genotipo silvestre ($LOJA_{Silv}$), mientras que el color rojo las muestras de genotipo domiciliar/peridomiciliar ($LOJA_{Dom-Peri}$). Edición figura: D. Pratt, OU.

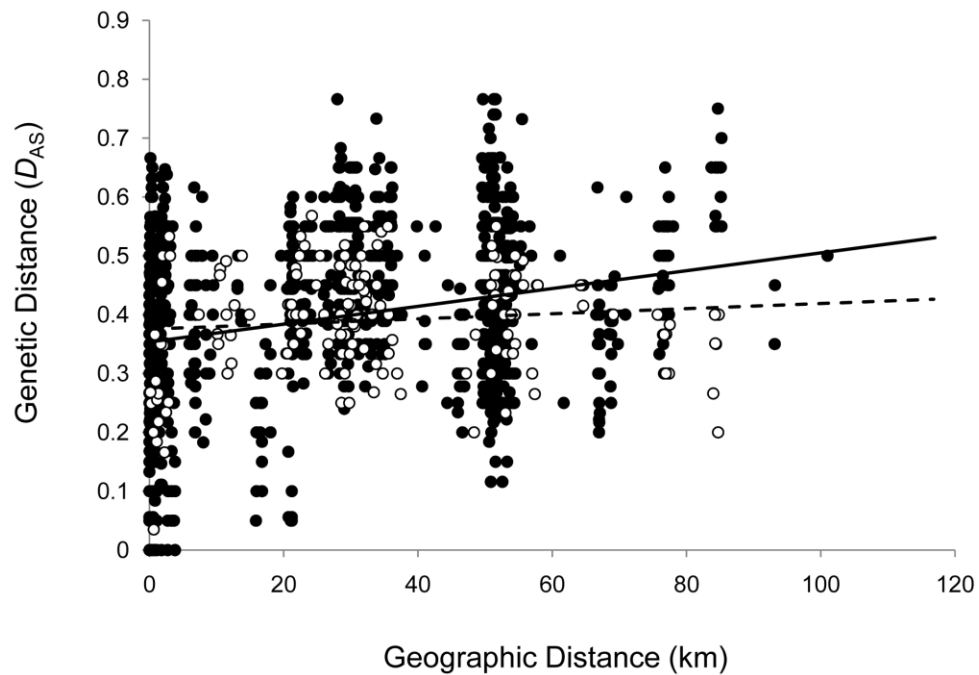


Figura 27. Estructura espacial y genética de las poblaciones de *T. cruzi* de la provincia de Loja. Se observa una correlación entre la distancia genética (D_{AS}) y la distancia geográfica entre las muestras de genotipo silvestre ($LOJA_{Silv}$) (círculos negros), mientras que no existe correlación significativa entre los aislados de genotipo domiciliar/peridomiciliar ($LOJA_{Dom-Peri}$), lo que indica flujo de parásitos entre estas poblaciones a lo largo de la provincia de Loja.

10.TABLAS

Tabla 1. Nomenclatura de los linajes de *T. cruzi* de acuerdo a la última reunión de estandarización

Nomenclatura actual	Equivalencia a esquemas previos
TcI	<i>T. cruzi</i> I y DTU I
TcII	<i>T. cruzi</i> II y DTU IIb
TcIII	Z3/Z1 ASAT, Z3-A, DTU IIc y <i>T. cruzi</i> III
TcIV	Z3, Z3-B y DTU IIa
TcV	Bolivia Z2, rDNA 1/2, clonet 39 y DTU II d
TcVI	Paraguay Z2, zimodema B y DTU II e

Modificado de Zingales *et al.*, 2009

Tabla 2. Información geográfica de las comunidades en donde se obtuvieron muestras de ADN de heces/contenido intestinal (insectos vectores) y sangre (mamíferos) para determinar los índices de infección con *T. cruzi* ó *T. rangeli*

Comunidad	Código	Provincia	Cantón	Longitud	Latitud	Rango de altura (m)	Análisis triatominos	Análisis mamíferos
Chaquizca	CQ	Loja	Calvas	-79,5901	-4,2326	991 - 1930	x	
Guara	GA	Loja	Calvas	-79,5798	-4,2501	1035 - 1325	x	
Pindo Alto	PD	Loja	Calvas	-79,4405	-4,4053	1117 - 1435		x
Jacapo	JP	Loja	Calvas	-79,6269	-4,3160	1500 - 1900	x	x
Zambi	ZB	Loja	Catamayo	-79,5349	-3,9154	1420 - 1735	x	
La Extensa	EX	Loja	Catamayo	-79,3618	-4,0395	1207 - 1295	x	x
El Huayco	HY	Loja	Catamayo	-79,3228	-4,0910	1128 - 1468	x	
Amarillos	AM	Loja	Chaguarpamba	-79,6928	-3,8728	948 - 1265	x	
Jorupe	JR	Loja	Chaguarpamba	-79,5780	-3,8724	1260 - 1670	x	
Venecia	VN	Loja	Chaguarpamba	-79,5780	-3,8724	830 - 1430	x	
Algarrobillo	AB	Loja	Celica	-80,0644	-4,1723	730 - 850	x	
El Guineo	GN	Loja	Celica	-80,0334	-4,1998	585 - 750	x	x
La Ciénega	CG	Loja	Celica	-80,0995	-4,2100	580 - 870	x	x
Cangochara	GR	Loja	Espíndola	-79,4112	-4,5467	1880 - 2040	x	
Machay	MY	Loja	Espíndola	-79,4510	-4,6186	1700 - 2500	x	
Potrerillos	TL	Loja	Espíndola	-79,4057	-4,5296	1440 - 1560	x	

Tabla 2. Información geográfica de las comunidades en donde se obtuvieron muestras de ADN de heces/contenido intestinal (insectos vectores) y sangre (mamíferos) para determinar los índices de infección con *T. cruzi* ó *T. rangeli* (continuación...)

Comunidad	Código	Provincia	Cantón	Longitud	Latitud	Rango de altura (m)	Análisis triatominos	Análisis mamíferos
Guarango	GO	Loja	Espíndola	-79,4057	-4,5296	1440 - 1500	x	
El Tambo	TA	Loja	Espíndola	-79,4080	-4,4726	1490 - 1780		x
Tundurama	TD	Loja	Espíndola	-79,4019	-4,5022	1340 - 2035	x	
Sanambay	SY	Loja	Espíndola	-79,4524	-4,5982	1750 - 1960	x	x
Santa Teresita	TS	Loja	Espíndola	-79,4109	-4,5687	1750 - 2130	x	
Jurupe	JU	Loja	Gonzanamá	-79,5185	-4,1864	1600 - 1860	x	
San Jacinto	SJ	Loja	Gonzanamá	-79,3536	-4,0921	987 - 1230	x	x
Santa Ester	ST	Loja	Gonzanamá	-79,5582	-4,1239	1070 - 1206	x	
Santa Rita	RT	Loja	Gonzanamá	-79,3472	-4,1143	987 - 1230	x	x
Ashimingo	AH	Loja	Paltas	-79,7305	-4,0436	870 - 1150	x	
Bramaderos	BR	Loja	Paltas	-79,8223	-4,0793	850 - 1320	x	x
Coamine	CE	Loja	Paltas	-79,6112	-4,1294	955 - 1628	x	x
El Limón	LM	Loja	Paltas	-79,8114	-4,0497	987 - 1230	x	
El Sauce	SC	Loja	Paltas	-79,6606	-4,0265	1020 - 1500	x	
Higinda	HG	Loja	Paltas	-79,7543	-4,1093	1288 - 1961	x	
Las Cochas	CC	Loja	Paltas	-79,5563	-4,0556	1060 - 1395	x	

Tabla 2. Información geográfica de las comunidades en donde se obtuvieron muestras de ADN de heces/contenido intestinal (insectos vectores) y sangre (mamíferos) para determinar los índices de infección con *T. cruzi* ó *T. rangeli* (continuación...)

Comunidad	Código	Provincia	Cantón	Longitud	Latitud	Rango de altura (m)	Análisis triatominos	Análisis mamíferos
Lucarqui	LU	Loja	Paltas	-79,8350	-4,1247	680 - 755	x	
Naranjo Dulce	ND	Loja	Paltas	-79,7006	-4,0821	1200 - 1650	x	x
Tacoranga	TC	Loja	Paltas	-79,7074	-4,1111	1000 - 1650	x	
Sabanilla	SA	Loja	Paltas	-79,7657	-4,0379	870 - 925	x	
Vega del Carmen	VC	Loja	Paltas	-79,5901	-4,1061	1007 - 1532	x	
Playas	PL	Loja	Paltas	-79,6934	-4,0291	920 - 1280		x
Yamana	YM	Loja	Paltas	-79,6992	-4,0022	990 - 1110	x	
Pitayo	PT	Loja	Puyango	-80,1832	-4,0068	640 - 880	x	
San Francisco	SF	Loja	Puyango	-80,1711	-4,0072	700 - 880	x	
Mangahurquillo	MG	Loja	Puyango	-80,2712	-4,0519	240-305	x	
Galápagos	GL	Loja	Quilanga	-79,4344	-4,3523	1200 - 1400	x	x
Santa Rosa	SS	Loja	Quilanga	-79,4186	-4,3960	1250 - 1720	x	
Tuburo	TR	Loja	Quilanga	-79,4269	-4,3741	1180 - 1285	x	
Jacapo	JQ	Loja	Quilanga	-79,4162	-4,3662	1260 - 1600	x	x
Gualguama	GG	Loja	Sozoranga	-79,7565	-4,3720	1204 - 2030		x
Nueva Fátima	NF	Loja	Sozoranga	-79,8218	-4,2702	1500 - 1700		x

Tabla 2. Información geográfica de las comunidades en donde se obtuvieron muestras de ADN de heces/contenido intestinal (insectos vectores) y sangre (mamíferos) para determinar los índices de infección con *T. cruzi* ó *T. rangeli* (continuación)

Comunidad	Código	Provincia	Cantón	Longitud	Latitud	Rango de altura (m)	Análisis triatominos	Análisis mamíferos
Cochas del Almendro	CA	Loja	Quilanga	-80,2789	-4,2001	520 - 590		x
Jaguay	HW	Loja	Quilanga	-80,1465	-4,2596	300 - 340	x	
Limonos	LI	Loja	Quilanga	-80,3492	-4,3834	150 - 190		x
Cruz Alta	CA	Manabí	Portoviejo	-80,2776	-0,9950	105 - 250	x	x
El Bejuco	BJ	Manabí	Portoviejo	-80,3470	-0,9721	65 - 400	x	x
Jesús María	JM	Manabí	Portoviejo	-80,2248	-1,0270	75 - 130	x	
La Ciénega	CN	Manabí	Portoviejo	-80,3590	-1,0200		x	
La Encantada	LE	Manabí	Portoviejo	-80,3519	-0,9923	19 - 290	x	x
Maconta Abajo	MB	Manabí	Portoviejo	-80,3733	-1,0830	68 - 144	x	
Naranjo Adentro	NA	Manabí	Portoviejo	-80,3220	-0,9630		x	
Pimpiguasí	PI	Manabí	Portoviejo	-80,3681	-1,1399	24 - 70	x	x
Quebrada de Maconta	QM	Manabí	Portoviejo	-80,3630	-1,0600		x	
San Gabriel	SG, ZL	Manabí	Portoviejo	-80,3792	-1,0127		x	
San Gregorio	NG	Manabí	Portoviejo	-80,2373	-1,0310	74 - 220	x	

Tabla 3. Primers de los 10 microsatélites polimórficos utilizados en este estudio

Cromosoma^a (marcador)	Posición	Código de Primer^b	Secuencia de primer (5'-3')
6-S (famp1b)	-	mclf10	GCGTAGCGATTCATTTCC ATCCGCTACCACTATCCAC
10-P (1TETP12a)	-	6855(TA)(GA)	TGTGATCAACGCGCATAAAT TTCCATTGCCTCGTTTTAGA
19-S (petp4a)	-	TcUn3	CTTAAAGAGATACAAGAGGGAAGG CTGTTATTTCAATAACACGGGG
27-S (vicp1b)	-	10101(TAA)a	CCGCGGTAGAAGAACCATAA TGCGTATTCACGACGAGAAG
37-Paltas (1TETP3a)	-	10187(TA)	AGAAAAAGGTTTACAACGAGCG CGATGGAGAACGTGAAACAA
39-S (nedp8a)	171.499	6925(TG)b	GAAACGCACTCACCCACAC GGTAGCAACGCCAAACTTTC
39-S (vicp2a)	212.18	6925(CT)	CATCAAGGAAAAACGGAGGA CGGTACCACCTCAAGGAAAG
39-S (tetp8a)	49.862	7093(TA)c	CGTGTGCACAGGAGAGAAAA CGTTTGGAGGAGGATTGAGA
40-Paltas (famp8a)	542.157	11283(TCG)	ACCACCAGGAGGACATGAAG TGTACACGGAACAGCGAAG
40-Paltas (famp8b)	613.8	11283(TA)b	AACATCCTCCACCTCACAGG TTTGAATGCGAGGTGGTACA

^a Weatherly *et al.*, 2009^b Llewellyn *et al.*, 2009

Tabla 4. Porcentaje de infección con *T. cruzi* y *T. rangeli*, por hábitat de colección y especie, en triatominos colectados en comunidades rurales de las provincias de Manabí (2004-2008) y Loja (2005-2009)

PROVINCIA DE MANABÍ						
Especie triatolino y hábitat de captura	No.	ninfas (n)	adultos (a)	Porcentaje de infección		
				<i>T. cruzi</i> (n/a)	<i>T. rangeli</i> (n/a)	Mixto (n/a)
Peridomicilio						
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	116	53	63	32,8 (11/27)	19,0 (16/6)	1,7 (2/0)
<i>Panstrongylus howardi</i>	47	44	3	53,2 (24/1)	4,3 (2/0)	4,3 (2/0)
Total peridomicilio	163	97	66	38,7	14,7	2,5
Silvestre						
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	34	17	17	29,4 (4/6)	14,7(2/3)	11,8 (4/0)
<i>Panstrongylus rufotuberculatus</i>	1	-	1	-	-	-
Total Silvestre	35	17	18	28,6	14,3	11,4
Por especie						
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	150	70	80	32,0	18,0	4,0
<i>Panstrongylus howardi</i>	47	44	3	53,2	4,3	4,3
<i>Panstrongylus rufotuberculatus</i>	1		1	-	-	-
Total Manabí	198	114	84	36,9 (39/34)	14,6 (20/9)	4,0 (8/0)

Tabla 4. Porcentaje de infección con *T. cruzi* y *T. rangeli*, por hábitat de colección y especie, en triatomos colectados en comunidades rurales de las provincias de Manabí (2004-2008) y Loja (2005-2009) (continuación)

PROVINCIA DE LOJA						
Especie triatomo y hábitat de captura	No.	ninfas (n)	adultos (a)	Porcentaje de infección		
				<i>T. cruzi</i> (n/a)	<i>T. rangeli</i> (n/a)	Mixto (n/a)
Domicilio						
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	72	28	44	30,6 (1/21)	2,8 (2/0)	-
<i>Triatoma carrioni</i>	187	109	78	4,8 (5/4)	1,1 (1/1)	-
<i>Panstrongylus chinai</i>	88	38	50	12,5 (5/6)	3,4 (2/1)	1,1 (0/1)
<i>Panstrongylus rufotuberculatus</i>	12	8	4	-	-	-
Total domicilio	359			11,7	1,9	0,3
Peridomicilio						
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	263	87	176	9,9 (9/17)	0,4 (0/1)	-
<i>Triatoma carrioni</i>	132	86	46	7,6 (4/6)	-	-
<i>Panstrongylus chinai</i>	21	12	9	9,5 (1/1)	4,8 (1/0)	-
Total peridomicilio	416			9,1	0,5	-
Silvestre						
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	301	144	157	55,8 (62/106)	7,6 (19/4)	9,0 (13/14)
Por especie						
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	635	259	377	34,0	4,1	4,2
<i>Triatoma carrioni</i>	319	195	124	6,0	0,6	-
<i>Panstrongylus chinai</i>	109	50	59	11,9	3,7	0,9
<i>Panstrongylus rufotuberculatus</i>	12	8	4	-	-	-
Total Loja	1076	512	564	23,0 (87/161)	3,0 (25/7)	2,6 (13/15)
Total Loja y Manabí	1274	626	648	25,2 (126/195)	4,8 (45/16)	2,8 (21/15)

(-) representa 0% de infección

Tabla 5. Porcentaje de infección con *T. cruzi* y *T. rangeli*, por hábitat de colección y especie, en mamíferos colectados en comunidades rurales de las provincias de Loja (2002-2009) y Manabí (2004-2007)

PROVINCIA DE MANABÍ				
Especie y hábitat de captura	No.	Porcentaje de infección		
		<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	Mixto
Domicilio				
<i>Mus musculus</i>	12	-	-	-
<i>Rattus rattus</i>	4	-	-	-
<i>Ratus sp.</i>	1	-	-	-
Total domicilio	17	-	-	-
Peridomicilio				
<i>Didelphis marsupialis</i>	24	70,8	-	-
<i>Mus musculus</i>	3	33,3	-	-
<i>Philander opossum</i>	3	66,7	-	-
<i>Proechimys decumanus</i>	9	-	-	-
<i>Rattus rattus</i>	8	-	-	-
<i>Rattus sp.</i>	2	-	-	-
Total peridomicilio	49	40,8	-	-
Silvestre				
<i>Didelphis marsupialis</i>	5	20,0	-	-
<i>Handleyomys alfaroi</i>	2	-	-	-
<i>Hoplomys gymnurus</i>	7	-	-	-
<i>Marmosa robinsoni</i>	5	-	-	-
<i>Mus musculus</i>	3	-	-	-
<i>Proechimys decumanus</i>	7	-	-	-
<i>Transandinomys talamancae</i>	2	-	-	-
Crisetidae	4	-	-	-
Echimydae	1	-	-	-
Total Silvestre	36	2,8	-	-
Por orden				
Rodentia (roedores)				
<i>Handloyomys alfaroi</i>	2	-	-	-
<i>Hoplomys gymnurus</i>	7	-	-	-
<i>Mus musculus</i>	18	5,6	-	-
<i>Proechimys decumanus</i>	16	-	-	-
<i>Rattus rattus</i>	12	-	-	-

Tabla 5. Porcentaje de infección con *T. cruzi* y *T. rangeli*, por hábitat de colección y especie, en mamíferos colectados en comunidades rurales de las provincias de Loja (2002-2009) y Manabí (2004-2007) (continuación...)

Especie y hábitat de captura	No.	Porcentaje de infección		
		<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	Mixto
<i>Rattus sp.</i>	3	-	-	-
<i>Transandinomys talamancae</i>	2	-	-	-
Cricetidae	4	-	-	-
Echimyidae	1	-	-	-
Total rodentia	65	1,5	-	-
Didelphimorphia (marsupiales)				
<i>Didelphis marsupialis</i>	29	62,1	-	-
<i>Marmosa robinsoni</i>	5	-	-	-
<i>Philander opossum</i>	3	66,7	-	-
Total didelphimorphia	37	54,1	-	-
Total Manabí	102	20,6	-	-
PROVINCIA DE LOJA				
Domicilio				
<i>Aegialomys xantheolus</i>	1	100,0	-	-
<i>Anoura sp.</i>	5	40,0	-	-
<i>Cavia porcellus</i>	8	-	-	-
<i>Didelphis marsupialis</i>	2	-	-	-
<i>Mus musculus</i>	77	15,6	-	-
<i>Rattus norvegicus</i>	4	25,0	-	-
<i>Rattus rattus</i>	91	8,8	-	-
<i>Rhipidomys latimanus</i>	1	100,0	-	-
Molossidae	1	-	-	-
Total domicilio	190	13,1	-	-
Peridomicilio				
<i>Aegialomys xantheolus</i>	1	-	-	-
<i>Akodon orophilus</i>	4	-	-	-
<i>Artibeus sp.</i>	1	-	-	-
<i>Didelphis marsupialis</i>	62	22,6	-	-
<i>Didelphis pernigra</i>	1	-	-	-

Tabla 5. Porcentaje de infección con *T. cruzi* y *T. rangeli*, por hábitat de colección y especie, en mamíferos colectados en comunidades rurales de las provincias de Loja (2002-2009) y Manabí (2004-2007) (continuación...)

Especie y hábitat de captura	No.	Porcentaje de infección		
		<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	Mixto
<i>Mus musculus</i>	3	-	-	-
<i>Rattus rattus</i>	41	9,7	-	-
<i>Sigmodon peruanus</i>	1			
Total peridomicilio	114	15,8	-	-
Silvestre				
<i>Aegialomys xantheolus</i>	3	33,3		-
<i>Akodon sp.</i>	7	28,6		
<i>Cavia porcellus</i>	1	-	-	-
<i>Desmodus rotundus</i>	3	33,3	-	-
<i>Didelphis marsupialis</i>	55	21,8	1,8	1,8
<i>Micoureus phaeus</i>	12	-	-	-
<i>Rattus rattus</i>	8	37,5	-	-
<i>Rattus sp.</i>	2	-	-	-
<i>Rhipidomys latimanus</i>	1	-	-	-
<i>Rhipidomys leucodactylus</i>	6	-	-	16,6
<i>Sciurus stramineus</i>	11	36,4	-	-
Crisetidae	5	40,0	-	-
Total silvestre	114	21,9	0,9	1,8
Por orden				
Rodentia (roedores)				
<i>Aegialomys xantheolus</i>	5	40,0	-	-
<i>Akodon orophilus</i>	4	-	-	-
<i>Akodon sp.</i>	7	28,6		
<i>Cavia porcellus</i>	9	-	-	-
<i>Mus musculus</i>	80	15,0	-	-
<i>Rattus norvegicus</i>	4	25,0	-	-
<i>Rattus rattus</i>	140	10,7	-	-
<i>Rattus sp.</i>	2	-	-	-
<i>Rhipidomys latimanus</i>	2	50	-	-
<i>Rhipidomys leucodactylus</i>	6	-	-	16,7
<i>Sciurus stramineus</i>	11	36,4	-	-
<i>Sigmodon peruanus</i>	1	-	-	-
Crisetidae	5	40,0	-	-
Total rodentia	276	14,1	-	0,6

Tabla 5. Porcentaje de infección con *T. cruzi* y *T. rangeli*, por hábitat de colección y especie, en mamíferos colectados en comunidades rurales de las provincias de Loja (2002-2009) y Manabí (2004-2007) (continuación)

Especie y hábitat de captura	No.	Porcentaje de infección		
		<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>	Mixto
Didelphimorphia (marsupiales)				
<i>Didelphis marsupialis</i>	119	21,8	0,8	0,8
<i>Didelphis pernigra</i>	1	-	-	-
<i>Micoureus phaeus</i>	12	-	-	-
Total didelphimorphia	132	19,7	0,7	0,7
Chiroptera (murciélagos)				
<i>Anoura sp.</i>	5	40,0	-	-
<i>Artibeus sp.</i>	1	-	-	-
<i>Desmodus rotundus</i>	3	33,3	-	-
Molossidae	1	-	-	-
Total chiroptera	10	30,0	-	-
Total Loja	418	16,3	0,2	0,5
TOTAL LOJA Y MANABÍ	520	17,1	0,2	0,4

(-) representa 0% de infección

Tabla 6. Resultado de la caracterización de muestras (tamaño de bandas) de Loja y Manabí con los marcadores *hsp60*, *gpi* y 24Sα rARN

Código muestra	Hospedero	Localidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura	<i>hsp60</i>	<i>Gpi</i>	24Sα rARN	Linaje <i>T. cruzi</i>
EX319	<i>P. chinai</i>	La Extensa	Catamayo	Loja	intradomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
EX320	<i>P. chinai</i>	La Extensa	Catamayo	Loja	intradomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
CG605	<i>R. ecuadoriensis</i>	La Ciénega	Celica	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
RT672	<i>P. chinai</i>	Santa Rita	Catamayo	Loja	intradomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
CE682	<i>P. chinai</i>	Coamine	Paltas	Loja	intradomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
CE701	<i>R. ecuadoriensis</i>	Coamine	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
CE704	<i>R. ecuadoriensis</i>	Coamine	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ712	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ713	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ714	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ715	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ718	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ721	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ737	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ744	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ795	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI

Tabla 6. Resultado de la caracterización de muestras (tamaño de bandas) de Loja y Manabí con los marcadores *hsp60*, *gpi* y 24Sα rARN (continuación...)

Código muestra	Hospedero	Localidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura	<i>hsp60</i>	<i>Gpi</i>	24Sα rARN	Linaje <i>T. cruzi</i>
SJ796	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
JQ803	<i>R. ecuadoriensis</i>	Jacapo	Quilanga	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
JQ804	<i>R. ecuadoriensis</i>	Jacapo	Quilanga	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
GA817	<i>P. chinai</i>	Guara	Calvas	Loja	intradomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
CG1031	<i>R. ecuadoriensis</i>	La Ciénega	Celica	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ1079	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ1080	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ1081	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ1082	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ1083	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ1127	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ1132	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TGL004	<i>R. ecuadoriensis</i>	Galápagos	Quilanga	Loja	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TGL031	<i>R. ecuadoriensis</i>	Galápagos	Quilanga	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TGL032	<i>R. ecuadoriensis</i>	Galápagos	Quilanga	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TJU034	<i>T. carrioni</i>	Jurupe	Calvas	Loja	intradomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI

Tabla 6. Resultado de la caracterización de muestras (tamaño de bandas) de Loja y Manabí con los marcadores *hsp60*, *gpi* y 24Sα rARN (continuación...)

Código muestra	Hospedero	Localidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura	<i>hsp60</i>	<i>Gpi</i>	24Sα rARN	Linaje <i>T. cruzi</i>
TGL041	<i>R. ecuadoriensis</i>	Galápagos	Quilanga	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TGL049	<i>R. ecuadoriensis</i>	Galápagos	Quilanga	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR112	<i>P. chinai</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	intradomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR123	<i>R.s ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	intradomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TGN125	<i>R.s ecuadoriensis</i>	Guineo	Célica	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR149	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR150	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR152	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR153	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR154	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR155	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR194	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR200	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR209	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TST216	<i>P. chinai</i>	Santa Ester	Gonzanamá	Loja	intradomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR218	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI

Tabla 6. Resultado de la caracterización de muestras (tamaño de bandas) de Loja y Manabí con los marcadores *hsp60*, *gpi* y 24Sα rARN (continuación...)

Código muestra	Hospedero	Localidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura	<i>hsp60</i>	<i>Gpi</i>	24Sα rARN	Linaje <i>T. cruzi</i>
TBR224	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR226	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR230	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR240	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR241	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR248	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR249	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR220	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR136	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TSA170	<i>R. ecuadoriensis</i>	Sabanilla	Celica	Loja	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR238	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR204	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR237	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TJU095	<i>T. carrioni</i>	Jurupe	Calvas	Loja	intradomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR193	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
GL550	<i>R. ecuadoriensis</i>	Galápagos	Quilanga	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI

Tabla 6. Resultado de la caracterización de muestras (tamaño de bandas) de Loja y Manabí con los marcadores *hsp60*, *gpi* y 24Sα rARN (continuación...)

Código muestra	Hospedero	Localidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura	<i>hsp60</i>	<i>Gpi</i>	24Sα rARN	Linaje <i>T. cruzi</i>
SJ726	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ733	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ738	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ778	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
CQ831	<i>R. ecuadoriensis</i>	Chaquizhca	Calvas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
GA895	<i>R. ecuadoriensis</i>	Guara	Calvas	Loja	intradomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TJU030	<i>T. carrioni</i>	Jorupe	Gonzanamá	Loja	intradomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
TBR163	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
GL500	<i>R. ecuadoriensis</i>	Galápagos	Quilanga	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
CE702	<i>R. ecuadoriensis</i>	Coamine	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
SJ717	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
SJ723	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
CQ800	<i>R. ecuadoriensis</i>	Chaquizhca	Calvas	Loja	intradomicilio	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
TGN081	<i>R. ecuadoriensis</i>	Guineo	Celica	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
TBR158	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
TBR215	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI

Tabla 6. Resultado de la caracterización de muestras (tamaño de bandas) de Loja y Manabí con los marcadores *hsp60*, *gpi* y 24Sα rARN (continuación...)

Código muestra	Hospedero	Localidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura	<i>hsp60</i>	<i>Gpi</i>	24Sα rARN	Linaje <i>T. cruzi</i>
TEX223	<i>R. ecuadoriensis</i>	La Extensa	Catamayo	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
TBR247	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
TBR199	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
CG1232	<i>R. rattus</i>	La Cienega	Celica	Loja	domicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
BR6383	<i>R. rattus</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
BR1349	<i>S. stramineus</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
CE1126	<i>D. marsupialis</i>	Coamine	Paltas	Loja	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
J1162	<i>R. rattus</i>	San Jacinto	Catamayo	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
CE1141	<i>R. rattus</i>	Coamine	Paltas	Loja	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
SJ1147	<i>D. marsupialis</i>	San Jacinto	Catamayo	Loja	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
BR1331	<i>D. marsupialis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
BR1329	<i>D. marsupialis</i>	Bramaderos	Paltas	Loja	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
MB374	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
BJ398	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
BJ399	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
J400	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI

Tabla 6. Resultado de la caracterización de muestras (tamaño de bandas) de Loja y Manabí con los marcadores *hsp60*, *gpi* y 24Sα rARN (continuación...)

Código muestra	Hospedero	Localidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura	<i>hsp60</i>	<i>Gpi</i>	24Sα rARN	Linaje <i>T. cruzi</i>
BJ401	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
BJ402	<i>P. howardi</i>	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
BJ403	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
ZL410	<i>R. ecuadoriensis</i>	Zapallo	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
ZL411	<i>R. ecuadoriensis</i>	Zapallo	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
ZL414	<i>R. ecuadoriensis</i>	Zapallo	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
ZL415	<i>R. ecuadoriensis</i>	Zapallo	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
ZL418	<i>R. ecuadoriensis</i>	Zapallo	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
BJ420	<i>P. howardi</i>	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
NG422	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Gregorio	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
BJ426	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
BJ433	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
BJ434	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
ZL441	<i>P. howardi</i>	Zapallo	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
NG451	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Gregorio	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
ZL454	<i>R. ecuadoriensis</i>	Zapallo	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI

Tabla 6. Resultado de la caracterización de muestras (tamaño de bandas) de Loja y Manabí con los marcadores *hsp60*, *gpi* y 24Sα rARN (continuación...)

Código muestra	Hospedero	Localidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura	<i>hsp60</i>	<i>Gpi</i>	24Sα rARN	Linaje <i>T. cruzi</i>
NG545	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Gregorio	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
MB561	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
MB564	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
MB565	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
MB567	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
MB572	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
MB573	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
MB574	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
CN103	<i>P. howardi</i>	La Ciénega	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
CN140	<i>P. howardi</i>	La Ciénega	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
BJ380	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
BJ385	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
JM424	<i>R. ecuadoriensis</i>	Jesús María	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
BJ456	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
BJ468	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
JM531	<i>R. ecuadoriensis</i>	Jesús María	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI

Tabla 6. Resultado de la caracterización de muestras (tamaño de bandas) de Loja y Manabí con los marcadores *hsp60*, *gpi* y 24Sα rARN (continuación)

Código muestra	Hospedero	Localidad	Cantón	Provincia	Hábitat de captura	<i>hsp60</i>	<i>Gpi</i>	24Sα rARN	Linaje <i>T. cruzi</i>
NG540	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Gregorio	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
MB559	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
MB560	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
MB562	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	Portoviejo	Manabí	silvestre	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
CN101	<i>P. howardi</i>	La Ciénega	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	n.a	TcI
PI7137	<i>D. marsupialis</i>	Pimpiguasí	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
CA7100	<i>P. opossum</i>	Cruz Alta	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
PI7139	<i>D. marsupialis</i>	Pimpiguasí	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
LE7148	<i>D. marsupialis</i>	La Encantada	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI
LE7161	<i>D. marsupialis</i>	La Encantada	Portoviejo	Manabí	peridomicilio	462 pb	817/447 pb	110 pb	TcI

Tabla 7. Origen y resultado de la caracterización de los aislados incluidos en el análisis de microsatélites de la provincia de Manabí

No.*	Código muestra	Población según D_{AS}	Hábitat de captura	Hospedero	Localidad	Linaje de <i>T. cruzi</i> (kDNA)
2	BJ385	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	TcI (<i>T. cruzi</i>)
3	BJ403	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	TcI (<i>T. cruzi</i>)
4	BJ420	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>P. howardi</i>	El Bejuco	TcI (<i>T. cruzi</i>)
5	NG540	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Gregorio	TcI (<i>T. cruzi</i>)
6	CN140	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>P. howardi</i>	La Ciénega	TcI (<i>T. cruzi</i>)
7	MB374	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	TcI (<i>T. cruzi</i>)
8	CA7100	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>P. opossum</i>	Cruz Alta	TcI (<i>T. cruzi</i>)
9	ZL418	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	Zapallo	TcI (<i>T. cruzi</i>)
10	ZL454	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	Zapallo	TcI (<i>T. cruzi</i>)
11	BJ402	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>P. howardi</i>	El Bejuco	TcI (<i>T. cruzi</i>)
12	BJ426	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	TcI (<i>T. cruzi</i>)
13	PI7139	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>D. marsupialis</i>	Pimpiguasí	TcI (<i>T. cruzi</i>)
14	LE7161	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>D. marsupialis</i>	La Encantada	TcI (<i>T. cruzi</i>)
15	NG422	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Gregorio	TcI (<i>T. cruzi</i>)
16	JM531	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	Jesús María	TcI (<i>T. cruzi</i>)
17	CN101	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>P. howardi</i>	La Ciénega	TcI (<i>T. cruzi</i>)
18	LE7148	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>D. marsupialis</i>	La Encantada	TcI (<i>T. cruzi</i>)

Tabla 7. Origen y resultado de la caracterización de los aislados incluidos en el análisis de microsatélites de la provincia de Manabí (continuación...)

No.*	Código muestra	Población según D_{AS}	Hábitat de captura	Hospedero	Localidad	Linaje de <i>T. cruzi</i> (kDNA)
19	CN103	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>P. howardi</i>	La Ciénega	TcI (<i>T. cruzi</i>)
20	BJ434	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	TcI (<i>T. cruzi</i>)
21	BJ433	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	TcI (<i>T. cruzi</i>)
22	ZL414	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	Zapallo	TcI (<i>T. cruzi</i>)
23	ZL411	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	Zapallo	TcI (<i>T. cruzi</i>)
24	ZL410	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	Zapallo	TcI (<i>T. cruzi</i>)
25	ZL441	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>P. howardi</i>	Zapallo	TcI (<i>T. cruzi</i>)
26	ZL415	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	Zapallo	TcI (<i>T. cruzi</i>)
27	BJ398	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	TcI (<i>T. cruzi</i>)
28	PI7137	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>D. marsupialis</i>	Pimpiguasí	TcI (<i>T. cruzi</i>)
29	BJ399	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	TcI (<i>T. cruzi</i>)
30	BJ400	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	TcI (<i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>)
31	BJ401	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	TcI (<i>T. cruzi</i>)
32	BJ380	MANABI _{Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	TcI (<i>T. cruzi</i>)
33	BJ468	MANABI _{Silv}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	TcI (<i>T. cruzi</i>)
34	JM424	MANABI _{Silv}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	Jesús María	TcI (<i>T. cruzi</i>)
35	NG545	MANABI _{Silv}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Gregorio	TcI (<i>T. cruzi</i>)

Tabla 7. Origen y resultado de la caracterización de los aislados incluidos en el análisis de microsatélites de la provincia de Manabí (continuación)

No.*	Código muestra	Población según <i>D_{AS}</i>	Hábitat de captura	Hospedero	Localidad	Linaje de <i>T. cruzi</i> (kDNA)
36	MB559	MANABI _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	TcI (<i>T. cruzi</i>)
37	MB573	MANABI _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	TcI (<i>T. cruzi</i>)
38	BJ456	MANABI _{Silv}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Bejuco	TcI (<i>T. cruzi</i>)
39	MB572	MANABI _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	TcI (<i>T. cruzi</i>)
40	MB565	MANABI _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	TcI (<i>T. cruzi</i>)
41	MB574	MANABI _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	TcI (<i>T. cruzi</i>)
42	MB564	MANABI _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	TcI (<i>T. cruzi</i>)
43	MB561	MANABI _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	TcI (<i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>)
44	MB567	MANABI _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	TcI (<i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>)
45	MB562	MANABI _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Maconta Abajo	TcI (<i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>)

* el número corresponde a la ubicación de la muestra en el dendrograma de la figura 24

Tabla 8. Origen y resultado de la caracterización de los aislados incluidos en el análisis de microsatélites de la provincia de Loja

No.*	Código muestra	Población según STRUCTURE	Hábitat de captura	Hospedero	Localidad	Cantón	Latitud	Longitud	Linaje de <i>T. cruzi</i> (kDNA)
1	TJU034	LOJA _{Dom-Peri}	domicilio	<i>T. carrioni</i>	Jurupe	Gonzanamá	-4,183	-79,521	TcI (<i>T. cruzi</i>)
2	TJU030	LOJA _{Dom-Peri}	domicilio	<i>T. carrioni</i>	Jurupe	Gonzanamá	-4,188	-79,517	TcI (<i>T. cruzi</i>)
3	BR6383	LOJA _{Dom-Peri}	peridomicilio	<i>R. rattus</i>	Bramaderos	Paltas	-4,072	-79,834	TcI (<i>T. cruzi</i>)
4	TBR123	LOJA _{Dom-Peri}	domicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,079	-79,825	TcI (<i>T. cruzi</i>)
5	GA817	LOJA _{Dom-Peri}	domicilio	<i>P. chinai</i>	Guara	Calvas	-4,254	-79,580	TcI (<i>T. cruzi</i>)
6	BR1331	LOJA _{Dom-Peri}	Silvestre	<i>D. marsupialis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,078	-79,807	TcI (<i>T. cruzi</i>)
7	CE682	LOJA _{Dom-Peri}	domicilio	<i>P. chinai</i>	Coamine	Paltas	-4,123	-79,605	TcI (<i>T. cruzi</i>)
8	SJ778	LOJA _{Dom-Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,106	-79,347	TcI (<i>T. cruzi</i>)
9	SJ1147	LOJA _{Dom-Peri}	peridomicilio	<i>D. marsupialis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,094	-79,349	TcI (<i>T. cruzi</i>)
10	RT672	LOJA _{Dom-Peri}	domicilio	<i>P. chinai</i>	Santa Rita	Gonzanamá	-4,116	-79,348	TcI (<i>T. cruzi</i>)
11	SJ713	LOJA _{Dom-Peri}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,096	-79,344	TcI (<i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>)
12	CG1232	LOJA _{Dom-Peri}	domicilio	<i>R. rattus</i>	La Ciénega	Celica	-4,210	-80,099	TcI (<i>T. cruzi</i>)
13	CE1126	LOJA _{Dom-Peri}	peridomicilio	<i>D. marsupialis</i>	Coamine	Paltas	-4,135	-79,614	TcI (<i>T. cruzi</i>)
14	TGL004	LOJA _{Dom-Peri}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	Galápagos	Quilanga	-4,353	-79,432	TcI (<i>T. cruzi</i>)
15	CQ800	LOJA _{Dom-Peri}	domicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	Chaquizhca	Calvas	-4,237	-79,599	TcI (<i>T. cruzi</i>)
16	SJ1083	LOJA _{Dom-Peri}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,098	-79,343	TcI (<i>T. cruzi</i>)
17	BR1329	LOJA _{Dom-Peri}	Silvestre	<i>D. marsupialis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,078	-79,807	TcI (<i>T. cruzi</i>)
18	TBR199	LOJA _{Dom-Peri}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,077	-79,808	TcI (<i>T. cruzi</i>)
19	TGN081	LOJA _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Guineo	Celica	-4,196	-80,034	TcI (<i>T. cruzi</i>)
20	TBR193	LOJA _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,079	-79,825	TcI (<i>T. cruzi</i>)

Tabla 8. Origen y resultado de la caracterización de los aislados incluidos en el análisis de microsatélites de la provincia de Loja (continuación...)

No.*	Código muestra	Población según STRUCTURE	Hábitat de captura	Hospedero	Localidad	Cantón	Latitud	Longitud	Linaje de <i>T. cruzi</i> (kDNA)
21	TBR163	LOJA _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,075	-79,809	TcI (<i>T. cruzi</i>)
22	TBR230	LOJA _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,077	-79,822	TcI (<i>T. cruzi</i>)
23	TBR237	LOJA _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,077	-79,809	TcI (<i>T. cruzi</i>)
24	TBR153	LOJA _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,076	-79,809	TcI (<i>T. cruzi</i>)
25	TBR220	LOJA _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,078	-79,807	TcI (<i>T. cruzi</i>)
26	TBR218	LOJA _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,080	-79,824	TcI (<i>T. cruzi</i>)
27	EX320	LOJA _{Silv}	domicilio	<i>P. chinai</i>	La Extensa	Catamayo	-4,045	-79,361	TcI (<i>T. cruzi</i>)
28	EX319	LOJA _{Silv}	domicilio	<i>P. chinai</i>	La Extensa	Catamayo	-4,045	-79,361	TcI (<i>T. cruzi</i>)
29	TSA170	LOJA _{Silv}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	Sabanilla	Paltas	-4,039	-79,761	TcI (<i>T. cruzi</i>)
30	SJ712	LOJA _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,096	-79,344	TcI (<i>T. cruzi</i>)
31	CE1141	LOJA _{Silv}	peridomicilio	<i>R. rattus</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,095	-79,352	TcI (<i>T. cruzi</i>)
32	SJ1079	LOJA _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,106	-79,347	TcI (<i>T. cruzi</i>)
33	SJ1080	LOJA _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,106	-79,347	TcI (<i>T. cruzi</i>)
34	SJ744	LOJA _{Silv}	Silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,100	-79,351	TcI (<i>T. cruzi</i>)
35	SJ795	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,106	-79,347	TcI (<i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>)
36	SJ1081	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,098	-79,343	TcI (<i>T. cruzi</i>)
37	SJ1127	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,105	-79,347	TcI (<i>T. cruzi</i>)
38	SJ737	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,100	-79,351	TcI (<i>T. cruzi</i>)
39	SJ718	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,096	-79,344	TcI (<i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>)
40	SJ721	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,096	-79,344	TcI (<i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>)

Tabla 8. Origen y resultado de la caracterización de los aislados incluidos en el análisis de microsatélites de la provincia de Loja (continuación...)

No.*	Código muestra	Población según STRUCTURE	Hábitat de captura	Hospedero	Localidad	Cantón	Latitud	Longitud	Linaje de <i>T. cruzi</i> (kDNA)
41	SJ717	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,096	-79,344	TcI (<i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>)
42	SJ796	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,100	-79,351	TcI (<i>T. cruzi</i>)
43	SJ723	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,096	-79,344	TcI (<i>T. cruzi</i>)
44	SJ1082	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,098	-79,343	TcI (<i>T. cruzi</i>)
45	SJ1162	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. rattus</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,062	-79,205	TcI (<i>T. cruzi</i>)
46	TBR224	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,080	-79,824	TcI (<i>T. cruzi</i>)
47	TBR238	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,076	-79,809	TcI (<i>T. cruzi</i>)
48	SJ738	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	San Jacinto	Gonzanamá	-4,100	-79,351	TcI (<i>T. cruzi</i>)
49	TBR150	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,076	-79,809	TcI (<i>T. cruzi</i>)
50	TBR155	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,076	-79,809	TcI (<i>T. cruzi</i>)
51	TBR149	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,076	-79,809	TcI (<i>T. cruzi</i>)
52	TBR215	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,079	-79,807	TcI (<i>T. cruzi</i>)
53	TBR240	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,076	-79,809	TcI (<i>T. cruzi</i>)
54	TBR249	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,079	-79,807	TcI (<i>T. cruzi</i>)
55	TBR248	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,079	-79,807	TcI (<i>T. cruzi</i>)
56	TBR247	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,079	-79,807	TcI (<i>T. cruzi</i>)
57	TBR136	LOJA _{Silv}	peridomicilio	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,072	-79,834	TcI (<i>T. cruzi</i>)
58	TST216	LOJA _{Silv}	domicilio	<i>P. chinai</i>	Santa Ester	Gonzanamá	-4,125	-79,558	TcI (<i>T. cruzi</i>)
59	TBR152	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,076	-79,809	TcI (<i>T. cruzi</i>)
60	CG605	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	La Ciénega	Celica	-4,241	-79,583	TcI (<i>T. cruzi</i>)
61	TGN125	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	El Guineo	Celica	-4,195	-80,035	TcI (<i>T. cruzi</i>)

Tabla 8. Origen y resultado de la caracterización de los aislados incluidos en el análisis de microsatélites de la provincia de Loja (continuación)

No.*	Código muestra	Población según STRUCTURE	Hábitat de captura	Hospedero	Localidad	Cantón	Latitud	Longitud	Linaje de <i>T. cruzi</i> (kDNA)
62	CG1031	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	La Ciénega	Celica	-4,213	-80,103	TcI (<i>T. cruzi</i>)
63	TEX223	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	La Extensa	Catamayo	-4,044	-79,360	TcI (<i>T. cruzi</i>)
64	JQ803	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Jacapo	Quilanga	-4,364	-79,416	TcI (<i>T. cruzi</i>)
65	TGL031	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Galápagos	Quilanga	-4,353	-79,432	TcI (<i>T. cruzi</i>)
66	TGL032	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Galápagos	Quilanga	-4,353	-79,432	TcI (<i>T. cruzi</i>)
67	GL500	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Galápagos	Quilanga	-4,352	-79,434	TcI (<i>T. cruzi</i>)
68	TJU095	LOJA _{Silv}	domicilio	<i>T. carrioni</i>	Jurupe	Gonzanamá	-4,184	-79,521	TcI (<i>T. cruzi</i>)
69	TGL041	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Galápagos	Quilanga	-4,353	-79,432	TcI (<i>T. cruzi</i>)
70	TGL049	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Galápagos	Quilanga	-4,348	-79,432	TcI (<i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>)
71	TBR209	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,076	-79,809	TcI (<i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>)
72	TBR241	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,076	-79,809	TcI (<i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>)
73	TBR200	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,077	-79,808	TcI (<i>T. cruzi</i>)
74	TBR204	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,077	-79,808	TcI (<i>T. cruzi</i>)
75	TBR154	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,076	-79,809	TcI (<i>T. cruzi</i>)
76	TBR194	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,079	-79,825	TcI (<i>T. cruzi</i>)
77	BR1349	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>S. stramineus</i>	Bramaderos	Paltas	-4,078	-79,806	TcI (<i>T. cruzi</i>)
78	CE702	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Coamine	Paltas	-4,125	-79,623	TcI (<i>T. cruzi</i>)
79	CE704	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Coamine	Paltas	-4,125	-79,623	TcI (<i>T. cruzi</i>)
80	TBR226	LOJA _{Silv}	silvestre	<i>R. ecuadoriensis</i>	Bramaderos	Paltas	-4,082	-79,804	TcI (<i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i>)
81	TBR112	LOJA _{Silv}	domicilio	<i>P. chinai</i>	Bramaderos	Paltas	-4,083	-79,829	TcI (<i>T. cruzi</i>)

* el número corresponde a la ubicación de la muestra en el dendrograma de la figura 25

Tabla 9. Tamaño, en pares de bases, de los alelos de los aislados de la provincia de Manabí (continuación...)

Código muestra	Loci analizados									
	nedp8a	vicp1b	petp4a	vicp2a	1tetp12a	famp1b	1tetp4a	fam8b	famp8a	tetp8a
BJ402	108	156	158	174	155	189	111	177	128	189
	108	162	158	174	157	189	115	177	132	189
BJ426	108	156	158	174	147	189	107	177	128	189
	108	162	158	176	151	189	115	177	132	189
PI7139	108	156	158	174	147	189	107	177	132	189
	114	162	158	176	149	189	111	177	136	189
					151		115			
					155					
LE7161	108	156	158	174	149	189	107	177	132	189
	114	156	158	174	151	189	111	177	132	189
NG422	108	156	158	174	151	179	111	173	128	189
	108	156	158	174	151	189	117	177	132	189
JM531	108	156	146	174	151	189	115	173	132	189
	108	160	146	176	155	189	115	179	132	189
CN101	108	156	154	174	149	189	115	173	132	189
	114	160	158	176	151	189	115	177	132	191
LE7148	108	156	154	174	147	189	115	175	128	189
	108	164	158	176	157	189	117	175	132	189
CN103	108	156	154	176	n.a	189	115	173	128	189
	108	164	158	176	n.a	189	115	179	132	189
BJ434	108	162	154	174	149	189	107	177	128	189
	108	164	158	176	153	189	107	179	132	189

Tabla 9. Tamaño, en pares de bases, de los alelos de los aislados de la provincia de Manabí (continuación...)

Código muestra	Loci analizados									
	nedp8a	vicp1b	petp4a	vicp2a	1tetp12a	famp1b	1tetp4a	fam8b	famp8a	tetp8a
BJ433	108	162	154	174	149	189	107	177	128	189
	108	164	158	176	153	189	107	179	132	189
ZL414	108	156	154	174	147	189	107	173	128	189
	114	164	158	176	151	189	111	177	132	195
					165		113			
							115			
ZL411	108	156	154	174	147	189	107	173	128	189
	114	164	158	176	151	189	111	177	132	195
			162		165		113			
							115			
ZL410	108	156	158	174	147	189	111	177	128	189
	114	156	162	176	165	189	113	177	132	195
ZL441	108	156	152	174	n.a	189	111	177	128	189
	114	156	158	176	n.a	189	113	177	132	195
			162							
ZL415	108	156	146	174	147	189	111	177	128	189
	114	164	158	176	151	189	113	177	132	195
					165		115			
BJ398	108	156	162	174	187	189	n.a	175	128	n.a
	136	164	162	176	189	189	n.a	179	132	n.a
					191					
				209						
PI7137	108	156	154	174	149	189	111	173	128	191
	108	164	154	176	151	189	117	177	132	209
BJ399	108	156	154	174	149	189	107	175	128	189
	108	164	162	176	151	189	111	179	132	191

Tabla 9. Tamaño, en pares de bases, de los alelos de los aislados de la provincia de Manabí (continuación...)

Código muestra	Loci analizados									
	nedp8a	vicp1b	petp4a	vicp2a	1tetp12a	famp1b	1tetp4a	fam8b	famp8a	tetp8a
BJ400	108	156	154	174	149	189	107	175	128	189
	108	164	162	176	151	189	111	179	132	191
BJ401	108	156	154	176	149	189	107	175	128	189
	108	164	154	176	151	189	111	179	132	191
BJ380	108	156	154	174	149	189	107	175	128	189
	108	164	154	176	151	189	111	177	132	191
BJ468	106	162	152	172	147	179	107	173	136	189
	108	164	152	172	147	179	109	177	136	193
JM424	104	162	152	172	141	179	107	175	136	187
	108	162	152	172	151	179	107	181	136	193
NG545	106	168	152	172	n.a	179	107	175	136	187
	108	170	152	172	n.a	179	111	175	136	187
MB559	106	166	152	172	149	179	107	173	122	191
	106	172	152	174	149	179	107	179	136	193
MB573	112	172	152	174	n.a	179	107	173	136	187
	112	172	162	174	n.a	179	107	175	136	191
BJ456	108	172	150	174	n.a	179	n.a	177	126	187
	112	172	152	174	n.a	179	n.a	177	136	193
			162							
MB572	108	164	152	174	147	179	107	175	136	187
	112	172	152	174	151	179	111	179	136	191
MB565	108	168	152	176	151	179	107	177	126	191
	112	168	154	176	151	179	107	181	136	191
MB574	108	168	152	174	151	179	107	177	126	191
	112	172	154	174	151	179	107	181	136	191

Tabla 9. Tamaño, en pares de bases, de los alelos de los aislados de la provincia de Manabí (continuación)

Código muestra	Loci analizados									
	nedp8a	vicp1b	petp4a	vicp2a	1tetp12a	famp1b	1tetp4a	fam8b	famp8a	tetp8a
MB564	108	168	152	174	151	179	107	175	122	191
	112	168	154	174	151	179	107	181	126	191
			162						136	
MB561	108	162	152	174	n.a	179	105	173	132	189
	112	164	152	174	n.a	179	109	181	132	191
MB567	108	162	152	174	n.a	179	105	173	132	189
	112	164	152	174	n.a	179	109	181	132	191
MB562	108	162	152	174	n.a	179	n.a	173	132	189
	112	164	152	174	n.a	179	n.a	181	132	191

n.a = no se obtuvo productos de amplificación

Tabla 10. Tamaño, en pares de bases, de los alelos de los aislados de la provincia de Loja

Código muestra	Loci analizados									
	nedp8a	vicp1b	petp4a	vicp2a	1tetp12a	famp1b	1tetp4a	fam8b	famp8a	tetp8a
TJU034	109	154	154	176	151	187	114	177	128	191
	109	156	162	176	151	189	114	179	132	205
TJU030	109	154	154	176	151	187	114	177	128	191
	109	156	160	176	151	189	114	179	132	205
BR6383	109	154	156	176	151	187	116	177	128	191
	109	154	160	176	151	189	116	179	132	191
TBR123	109	154	154	176	151	189	114	177	132	191
	109	154	156	176	151	189	116	177	132	191
GA817	109	154	162	174	151	189	116	177	132	191
	109	156	162	176	151	189	116	179	132	191
BR1331	109	154	152	174	151	189	114	177	128	191
	109	166	160	176	151	189	116	179	132	205
CE682	109	162	152	174	151	189	114	177	128	191
	109	166	160	176	151	189	114	179	128	191
SJ778	109	154	152	174	151	179	114	177	128	191
	109	166	164	176	151	187	114	177	132	191
SJ1147	109	166	152	174	151	187	114	177	128	191
	109	166	152	176	151	189	114	177	132	191
RT672	109	154	152	176	151	187	114	177	132	191
	109	166	156	176	151	189	114	177	132	191
SJ713	109	154	152	174	151	191	114	177	128	191
	109	166	156	176	151	191	114	177	132	191
CG1232	109	154	156	174	151	191	114	177	132	189
	109	154	160	176	151	191	114	177	132	191
CE1126	109	166	152	174	151	179	114	177	128	205
	109	166	162	176	151	187	114	179	132	205

Tabla 10. Tamaño, en pares de bases, de los alelos de los aislados de la provincia de Loja (continuación...)

Código muestra	Loci analizados									
	nedp8a	vicp1b	petp4a	vicp2a	1tetp12a	famp1b	1tetp4a	fam8b	famp8a	tetp8a
TGL004	109	154	156	174	151	187	116	177	132	191
	109	162	162	174	151	189	116	177	132	205
CQ800	109	154	152	174	151	179	116	175	132	191
	109	156	154	176	151	189	116	179	132	191
		162	156							
		166								
SJ1083	109	154	152	174	151	179	110	177	128	191
	109	162	156	176	151	191	114	181	132	191
		166	162						136	
BR1329	106	154	152	172	151	179	114	173	132	189
	109	162	160	176	151	189	114	177	136	191
TBR199	106	154	152	172	151	179	110	173	132	191
	109	162	154	174	151	179	114	177	136	191
			162	176			116			
TGN081	106	154	152	174	149	179	114	175	136	189
	109	162	162	176	151	179	114	175	136	203
TBR193	106	162	152	172	149	179	110	173	136	189
	109	162	154	174	149	179	110	175	136	189
			162							
TBR163	109	162	152	174	149	179	110	173	136	189
	109	162	152	176	149	179	110	175	136	191
										197
TBR230	106	162	152	174	149	179	110	173	136	187
	109	162	152	176	149	179	114	175	136	189
								179		
TBR237	106	162	152	174	149	179	110	173	136	191
	109	162	152	176	151	179	110	175	136	193
TBR153	106	162	152	174	151	179	110	173	136	191
	109	162	152	176	151	179	110	175	136	193
TBR220	106	162	152	174	151	179	110	173	136	189
	109	162	162	176	151	179	110	175	136	191

Tabla 10. Tamaño, en pares de bases, de los alelos de los aislados de la provincia de Loja (continuación...)

Código muestra	Loci analizados									
	nedp8a	vicp1b	petp4a	vicp2a	1tetp12a	famp1b	1tetp4a	fam8b	famp8a	tetp8a
TBR218	106	162	152	174	ND	179	110	173	136	189
	109	164	152	176	ND	179	110	175	136	191
EX320	106	162	152	172	147	179	110	175	136	187
	109	162	152	176	149	179	110	175	136	189
EX319	106	162	152	172	147	179	110	175	136	187
	109	162	152	176	147	179	110	175	136	189
TSA170	106	162	152	174	151	179	108	175	136	187
	109	162	152	176	151	179	110	179	136	189
SJ712	109	162	152	174	151	179	110	175	136	187
	109	166	152	174	151	179	110	181	136	187
CE1141	109	162	152	174	151	179	110	175	136	187
	109	166	152	174	151	179	110	181	136	187
SJ1079	109	162	152	174	151	179	110	175	136	187
	109	166	152	174	151	179	110	181	136	187
SJ1080	109	162	152	174	151	179	110	175	136	187
	109	166	152	174	151	179	110	181	136	187
SJ744	109	162	152	174	151	179	110	175	118	187
	109	166	152	174	151	179	110	181	136	187
SJ795	109	162	152	174	151	179	110	175	118	187
	109	166	152	174	151	179	110	181	136	187
SJ1081	109	162	152	174	151	179	110	175	136	187
	109	166	162	174	151	179	110	181	136	187
SJ1127	109	162	154	174	151	179	110	175	136	187
	109	166	162	174	151	179	110	181	136	187
SJ737	106	166	152	172	151	179	110	175	136	187
	109	166	152	174	151	179	110	181	136	197
SJ718	109	162	152	172	151	179	110	175	136	187
	109	166	152	172	151	179	110	181	136	197
SJ721	109	162	152	172	151	179	110	175	136	187
	109	166	152	172	151	179	110	181	136	197

Tabla 10. Tamaño, en pares de bases, de los alelos de los aislados de la provincia de Loja (continuación...)

Código muestra	Loci analizados									
	nedp8a	vicp1b	petp4a	vicp2a	1tetp12a	famp1b	1tetp4a	fam8b	famp8a	tetp8a
SJ717	109	162	152	172	151	179	110	175	136	187
	109	166	152	172	151	179	110	181	136	197
SJ796	106	162	152	172	151	179	110	175	136	187
	109	166	152	174	151	179	110	181	136	187
SJ723	106	162	152	174	151	179	110	175	136	187
	109	166	152	174	151	179	110	181	136	189
SJ1082	106	162	152	172	151	179	110	175	136	187
	106	166	162	174	151	179	110	181	136	189
SJ1162	106	162	152	172	151	179	110	175	136	187
	106	166	152	174	151	179	110	181	136	189
TBR224	106	162	152	174	149	179	110	175	136	189
	109	166	152	174	151	179	110	175	136	189
TBR238	106	162	152	174	149	179	110	175	136	189
	109	166	152	174	151	179	110	175	136	189
SJ738	106	162	152	174	151	179	110	175	136	187
	109	166	152	174	151	179	110	175	136	189
TBR150	106	162	152	174	151	179	110	175	136	187
	106	166	152	174	151	179	114	175	136	187
TBR155	106	166	152	174	149	179	110	175	118	187
	106	174	152	174	151	179	114	175	136	187
TBR149	106	166	152	174	149	179	110	175	136	187
	106	174	160	174	151	179	114	175	136	187
TBR215	106	162	152	174	151	179	108	175	118	187
	106	166	156	174	151	179	108	175	136	187
TBR240	106	162	152	174	147	179	110	175	136	187
	109	166	158	174	151	179	114	175	136	187
			162							

Tabla 10. Tamaño, en pares de bases, de los alelos de los aislados de la provincia de Loja (continuación...)

Código muestra	Loci analizados									
	nedp8a	vicp1b	petp4a	vicp2a	1tetp12a	famp1b	1tetp4a	fam8b	famp8a	tetp8a
TBR249	106	162	152	174	147	179	110	175	136	187
	109	166	158	174	147	179	110	175	136	197
TBR248	106	162	152	174	147	179	110	175	136	187
	109	166	158	174	147	179	110	175	136	197
TBR247	106	162	152	174	149	179	106	175	136	187
	109	166	158	174	149	179	106	175	136	187
TBR136	106	162	152	174	151	179	110	173	136	187
	109	164	152	174	151	179	114	173	136	187
TST216	109	164	152	174	149	179	114	175	136	187
	109	164	152	174	149	179	114	175	136	195
TBR152	109	162	152	174	151	179	110	175	136	191
	109	174	152	174	153	179	110	175	136	191
CG605	106	162	152	174	141	179	110	175	122	189
	106	164	154	176	149	179	110	175	136	195
TGN125	106	160	152	172	141	179	110	175	118	189
	106	164	152	174	149	179	110	177	136	193
CG1031	106	164	152	172	147	179	106	175	132	187
	106	172	152	176	147	179	106	175	136	195
TEX223	106	160	152	172	149	179	110	175	118	189
	109	166	152	176	149	179	110	181	136	189
JQ803	106	160	152	174	149	179	102	173	118	195
	106	166	152	174	149	179	102	175	136	195
TGL031	106	160	152	172	151	179	106	175	136	189
	109	168	152	174	151	179	106	175	136	195
TGL032	106	160	152	172	ND	179	106	175	136	189
	109	168	152	174	ND	179	106	175	136	195
GL500	106	160	152	172	151	179	106	175	136	189
	109	168	152	174	151	179	106	175	136	195

Tabla 10. Tamaño, en pares de bases, de los alelos de los aislados de la provincia de Loja (continuación)

Código muestra	Loci analizados									
	nedp8a	vicp1b	petp4a	vicp2a	1tetp12a	famp1b	1tetp4a	fam8b	famp8a	tetp8a
TJU095	106	160	152	172	151	179	106	175	136	189
	109	168	162	174	151	179	106	175	136	195
TGL041	106	160	152	172	151	179	106	175	136	189
	109	168	152	174	151	179	106	175	136	189
TGL049	106	160	152	172	151	179	ND	175	136	189
	109	168	152	174	151	179	ND	175	136	195
TBR209	106	162	152	174	151	179	114	173	136	187
	106	166	152	174	151	179	114	179	136	197
TBR241	106	162	152	172	151	179	110	173	136	187
	106	166	152	174	151	179	114	179	136	189
		174								191
TBR200	106	162	152	172	ND	179	110	173	136	189
	106	162	152	174	ND	179	110	179	136	191
TBR204	106	162	152	172	151	179	110	173	136	189
	106	162	152	174	151	179	110	179	136	191
TBR154	106	162	152	172	147	179	106	177	136	189
	106	166	152	174	147	179	110	177	136	191
TBR194	106	162	152	174	147	179	108	173	136	189
	106	174	154	174	147	179	110	173	136	189
BR1349	106	162	152	174	147	179	108	173	132	191
	106	174	154	174	147	179	110	173	132	191
			162							
CE702	106	162	152	172	149	179	108	175	136	189
	106	164	162	174	149	179	108	177	136	189
CE704	106	162	152	172	ND	179	108	175	136	189
	106	164	152	174	ND	179	108	177	136	189
TBR226	106	163	152	172	147	179	108	173	136	189
	106	174	152	174	147	179	108	175	136	189
TBR112	103	162	152	174	151	179	108	177	136	187
	106	164	158	176	151	179	108	177	136	189
	109		162							191

n.a = no se obtuvo productos de amplificación

Tabla 11. Parámetros genéticos de las poblaciones de domicilio/peridomicilio y silvestre de la provincia de Loja.

Población	N/G	PL	AE	MA/S	$A_r \pm SE$	H_O^a	H_E^a	% PL H_E^b	% PL H_D^c	$F_{IS} \pm SE^d$	I_A^e	I_A p- value ^e	% PL PLD ^f
Domicilio/Peridomicilio <i>LOJA</i> _{Dom/Peri}	18/18	9	0,8	0,67	3,851 $\pm 0,527$	0,478	0,478	0	0	0,003 \pm 0,084	0,227	0,063	5,5
Silvestre <i>LOJA</i> _{Selv}	54/63	9	2,0	0,24	4,583 $\pm 0,504$	0,367	0,457	11,1	44,4	0,184 \pm 0,098	0,597	< 0,001	38,5

G = Número de aislados en cada población.

N = Número de genotipos multilocus de cada población.

PL= Número de loci polimórficos.

AE= Promedio del número de alelos exclusivos por locus.

MA/S = Promedio de múltiples alelos (3+) por muestra

A_r = Riqueza alélica \pm error estándar, calculado en FSTAT (44)

^a Promedio de heterocigidad observada y esperada en todos los loci, calculado en ARLEQUIN v3.1 (45)

^b Proporción de loci que muestran un exceso significativo de heterocigidad después de una corrección secuencial de Bonferroni. Calculado en ARLEQUIN v3.1 (45)

^c Proporción de loci que muestran un déficit de heterocigidad después de una corrección secuencial de Bonferroni. Calculado en ARLEQUIN v3.1 (45)

^d Media de FIS sobre loci \pm error estándar, calculado en FSTAT (44)

^e Índice de asociación.

^f Proporción de loci con ligamiento significativo.

11.ANEXOS

Anexo 1.

Pinto, C. M., **Ocaña-Mayorga, S.**, Lascano, M. S. and Grijalva, M. J. 2006. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. *Journal of Parasitology* 92(6): 1251–1255.

INFECTION BY TRYPANOSOMES IN MARSUPIALS AND RODENTS ASSOCIATED WITH HUMAN DWELLINGS IN ECUADOR

C. Miguel Pinto*, Sofía Ocaña-Mayorga, Mauricio S. Lascano†, and Mario J. Grijalva†‡

Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Escuela de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. e-mail: grijalva@ohio.edu

ABSTRACT: Small mammals trapped in domestic and peridomestic environments of rural Ecuador were screened for trypanosome infection by direct microscopy and hemoculture. Identification of species of trypanosomes was then performed by morphological characteristics and by polymerase chain reaction (PCR) assays. Of 194 animals collected, 15 were positive for infection (7.73%). Eight (4.12%) were infected with *Trypanosoma cruzi* (1 of 33 *Didelphis marsupialis*; 7 of 61 *Rattus rattus*). Eleven *R. rattus* (18.03%) harbored *T. lewisi*, 5 of which presented mixed infections with *T. cruzi*. Additionally, 1 of 3 *Oryzomys xanthaeolus* was infected with *T. rangeli*. No trypanosome infection was detected in *Philander opossum* (n = 1), *Mus musculus* (n = 79), *Rattus norvegicus* (n = 8), *Akodon orophilus* (n = 4), *Sigmodon peruanus* (n = 3), or *Proechimys decumanus* (n = 2). Many of the isolates belong to *T. cruzi*, the causative agent of Chagas disease, and *R. rattus* had the highest prevalence. Because of its abundance in the study areas, this species is considered an important reservoir for Chagas disease. This is the first report of *T. lewisi* and *T. rangeli* in Ecuador. This study is also the first to describe natural mixed infections of *T. cruzi*–*T. lewisi*.

Several species of trypanosomes infecting mammals have been reported in the Neotropical region (Hoare, 1972), with *Trypanosoma cruzi* (causative agent of Chagas disease [CD]) and *T. rangeli* being the most frequent and important species in terms of public health (Zeledón, 1974; WHO, 2002). A third species, *T. lewisi*, has been reported in association with commensal rats (*Rattus* spp.) in Chile, Brazil, and Venezuela (Linaudi and Botelho, 2002). Chagas disease is found from the southern United States to Chile and Argentina, infecting more than 18 million people in Latin America (WHO, 2002). Transmitted mainly by triatomine insects (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), other important modes of CD transmission involve blood transfusions and vertical transmission from mother to fetus (Zeledón, 1974). Synanthropic mammals act as reservoir hosts of the parasite and play an important role in the transmission of CD by connecting the sylvatic, peridomestic, and domiciliary cycles, thus transporting parasites or novel strains to the human dwellings where they are transmitted to humans and domestic animals by triatomines (Zeledón, 1974). *Trypanosoma rangeli* is important because of its antigenic cross-reactivity with *T. cruzi*, despite the lack of reported pathogenicity in the mammalian hosts. Additionally, the geographic distribution of *T. rangeli* often overlaps with that of *T. cruzi*, and both species share vectors and reservoirs (D'Alessandro and Saravia, 1992; Cuba-Cuba, 1998).

In Latin America, most reports on mammalian infections with trypanosomes have been focused on *T. cruzi*, and only few reports include *T. rangeli*, completely ignoring other species with no medical importance. Only the presence of *T. cruzi* has been reported in Ecuadorian mammals. However, in this study, we report the prevalence of 3 species of trypanosomes in several synanthropic mammals collected in rural communities of Loja and Guayas provinces in Ecuador, 2 areas endemic for CD, but ecologically different (Defranc-Issa, 1982; Aguilar et al., 1999).

Received 13 February 2006; revised 3 April 2006; accepted 19 May 2006.

* Present address: Department of Biological Sciences and Natural Sciences Research Laboratory, Texas Tech University, Lubbock, Texas 79409.

†Tropical Disease Institute, Department of Biomedical Sciences, College of Osteopathic Medicine, Ohio University, Athens, Ohio 45701.

‡To whom correspondence should be addressed.

MATERIALS AND METHODS

Study areas

Trapping for marsupials and rodents was conducted in July 2002 and July 2003 in 5 rural communities in Loja and 3 communities in Guayas Province. Loja is located in the southern Andean region of Ecuador, and the communities visited range from 825 to 2,200 m above sea level and presented extremely irregular topography (Grijalva et al., 2005). The natural formation of this region is the Mountain Dry Scrubland (Valencia et al., 1999), which is characterized by spiny bushes and cacti, with few ceibas and acacias. Agriculture is mainly restricted to humid localities, where peanuts, corn, sugarcane, and bananas are cultivated. Farm animals include primarily poultry, pigs, and goats, which forage free in the community. Guayas Province is located in the Pacific coastal region; the localities trapped ranged in altitude from 25 to 40 m and are dominated by Savanna (Cerón et al., 1999). Rice and fruit tree cultivation is widespread, and poultry and pigs are the main farm animals in this area.

The human habitations in Loja are mostly built of adobe walls with earth floors, and tile roofs (Grijalva et al., 2005). Most of the houses in Guayas are built on stilts to avoid flooding; the walls and floor are made of bamboo or wood, with the roofs of pleated zinc sheets.

Mammal collection

Sherman (model SFA, H.B. Sherman, Tallahassee, Florida) and Tomahawk (models 202 and 204, Tomahawk Live Trap Co, Tomahawk, Wisconsin) traps were placed inside human residences, in the yards, and in surrounding terrains up to 50 m from the house. The traps were baited with available local fruits and vegetables, such as bananas, corn, papaya, and peanuts, and they were located in places where synanthropic marsupials and rodents were most likely to be found, e.g., in the kitchen, storage rooms, empty barns, crop fields, and nearby vegetation patches. The average capture effort was 150 traps/night/community, ranging from 3 to 6 nights per locality. All trapped animals were killed in a CO₂ chamber.

Collection of samples

Samples of blood were obtained by cardiac puncture. Thick blood smears, and hematoxylin and eosin-stained slides were examined using direct microscopy. An aliquot of blood was inoculated into 10 ml of liver infusion triptose (LIT) culture medium (Chiari et al., 1989); 200 µl of blood was mixed with 20 µl of 0.2 M EDTA and maintained at –20 C until use. Samples of cardiac tissue were obtained and stored in 100% ethanol. Carcasses were preserved for taxonomic identification and deposited in the Museo de Zoología, sección de Vertebrados (QCAZ), and tissue samples were preserved frozen at the Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas (LIEI), both located in the Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.

Parasitological tests

Animals were considered infected if flagellates were observed in direct microscopic examination of 40 fields by using a $\times 400$ magnification of thick blood smear and hematoxylin and eosin-stained thin smears. In addition, animals were considered infected if flagellates were found in hemocultures within 30 days of inoculation with 0.5 to 1.0 ml of blood into 10.0 ml of LIT (Barr et al., 1991; Pung et al., 1995).

Trypanosome identification

Identification was performed by morphological characterization of hematoxylin and eosin-stained blood smears by using previously published guidelines (Hoare, 1972; D'Alessandro and Saravia, 1992; de Sousa, 1999). Polymerase chain reaction (PCR) was performed on DNA samples isolated from positive cultures and from blood or heart tissue from animals found to be positive by microscopy. The primers S35 and S36 were used to recognize *T. cruzi* and *T. rangeli* based on the different banding pattern; there is not evidence of amplification of other *Trypanosoma* spp. or other kinetoplastids with this primer set (Vallejo et al., 1999). The primers TRYP1R and TRYP1S differentiate *T. lewisi* of *T. vivax* by differences in the banding pattern and do not amplify *T. cruzi* or *T. rangeli*. Additionally, the amplified sequence (ITS1) of *T. lewisi* is not similar to homologous sequences of *Crithidia* spp., *Leishmania* spp., or other *Trypanosoma* spp. (Desquesnes et al., 2002).

RESULTS

In total, 194 mammals, including 2 marsupial and 7 rodent species, were captured. Fifteen animals (7.7%) were positive for trypanosomes. Eight (4.1%) were infected with *T. cruzi* (1/33 *D. marsupialis*; 7/61 *R. rattus*). Eleven *R. rattus* (18.0%) harbored *T. lewisi*; 5 of these animals presented mixed infections with *T. cruzi*. Additionally, the only animal infected with *T. rangeli* was a yellowish oryzomys, *Oryzomys xantheolus* (1/3). Other species, including the abundant *Mus musculus* (n = 79) were not positive (Table I).

Most of the animals were collected inside the houses (n = 131); of these animals, 9 (6.9%) *R. rattus* were positive for *T. cruzi*, *T. lewisi*, or both. In the yards outside the houses, 63 animals were trapped, including 7 individuals that were infected by trypanosomes, i.e., 1 *D. marsupialis* and 2 *R. rattus* with *T. cruzi*, another 2 *R. rattus* with mixed infections of *T. cruzi* and *T. lewisi*, and 1 *O. xantheolus* with *T. rangeli*. Despite the abundance of *M. musculus* inside the houses, none was infected.

Direct microscopy and LIT hemoculture were equally effective in detecting parasites in the present study (Table II). However, some samples, i.e., from 6 *R. rattus* and 1 *O. xantheolus*, were positive by using only 1 of the 2 tests performed (Table II). None of the mixed infections was detected by direct microscopy of stained slides; all were detected by PCR. Only 1 morphotype of a trypanosome, matching with *T. lewisi*, was detected in all the stained slides of individuals with mixed infections. However, PCR identification of mixed infections was specific and no cross-reaction was detected when using the different sets of primers. All the positive samples by microscopy and hemoculture were also positive by PCR.

DISCUSSION

Mixed infections by *T. lewisi* and *T. cruzi* are described here for the first time. This phenomenon seems to be rather frequent, because 5 of the 13 *R. rattus* were infected with both trypanosomes. The lack of use of molecular tools could have previously masked the presence of less abundant trypanosome species in the rat blood. For example, in this study, direct microscopy

TABLE I. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents collected in 8 localities in Ecuador. Total numbers of animals captured and examined, followed by number of infected individuals (in parentheses).

Province	Locality, longitude and latitude	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>Philander opossum</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Rattus rattus</i>	<i>Rattus rattus</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Akodon orophilus</i>	<i>Oryzomys xantheolus</i>	<i>Sigmodon peruanus</i>	<i>Proechimys decumanus</i>	Total
Loja	Pindo Alto 79°27'W, 4°25'S	1	—*	—	8 (2)†	—	—	—	—	1	—	10 (2)
	Jacapo 79°37'W, 4°19'S	—	—	1	4	—	3	—	—	—	—	8
	Bramaderos 79°49'W, 4°5'S	4	—	—	7 (2)‡	4	1	—	1 (1)§	—	—	17 (3)
	Playas 79°41'W, 4°2'S	1	—	1	10 (4)	—	7	—	—	—	—	19 (4)
	Naranjo Dulce 79°42'W, 4°5'S	1	—	2	9 (1)#	—	—	—	1	—	—	13 (1)
Guayas	Puerto Rico 80°1'W, 1°32'S	12 (1)‡	1	1	12 (2)#	—	24	—	—	—	2	52 (3)
	San Antonio 80°2'W, 1°37'S	4	—	—	5	—	12	—	1	2	—	24
	Macul 79°52'W, 1°37'S	10	—	3	6 (2)#	—	32	—	—	—	—	51 (2)
	Total	33 (1)	1	8	61 (13)	4	79	4	3 (1)	3	2	—
% Prevalence	3.03	0	0	21.31	0	0	0	33.33	0	0	0	7.73

* Hyphens (—) denote species not captured in the corresponding locality.

† Mixed infections of *T. cruzi* and *T. lewisi*.

‡ Infections by *T. cruzi*.

§ Individual infected with *T. rangeli*.

|| Three individuals with mixed infections of *T. cruzi* and *T. lewisi*, and 1 individual infected only with *T. lewisi*.

Individuals with infections by *T. lewisi*.

TABLE II. Positive animals for trypanosomes and the methods used for diagnosis of the trypanosomes.

Field code	Species	Locality	Capture site*	Direct microscopy	LIT†	Trypanosome species
6456	<i>D. marsupialis</i>	Puerto Rico	Per.	+	+	<i>T. cruzi</i>
6348	<i>R. rattus</i>	Pindo Alto	Per.	+	–	<i>T. cruzi</i> , <i>T. lewisi</i>
6356	<i>R. rattus</i>	Pindo Alto	Per.	+	–	<i>T. cruzi</i> , <i>T. lewisi</i>
6381	<i>R. rattus</i>	Bramaderos	Per.	–	+	<i>T. cruzi</i>
6383	<i>R. rattus</i>	Bramaderos	Per.	–	+	<i>T. cruzi</i>
6396	<i>R. rattus</i>	Playas	Dom.	+	–	<i>T. lewisi</i>
6400	<i>R. rattus</i>	Playas	Dom.	+	+	<i>T. cruzi</i> , <i>T. lewisi</i>
6403	<i>R. rattus</i>	Playas	Dom.	+	+	<i>T. cruzi</i> , <i>T. lewisi</i>
6404	<i>R. rattus</i>	Playas	Dom.	+	+	<i>T. cruzi</i> , <i>T. lewisi</i>
6419	<i>R. rattus</i>	Naranjo Dulce	Dom.	–	+	<i>T. lewisi</i>
6424	<i>R. rattus</i>	Puerto Rico	Dom.	+	+	<i>T. lewisi</i>
6428	<i>R. rattus</i>	Puerto Rico	Dom.	+	+	<i>T. lewisi</i>
6528	<i>R. rattus</i>	Macul	Dom.	+	+	<i>T. lewisi</i>
6529	<i>R. rattus</i>	Macul	Dom.	+	+	<i>T. lewisi</i>
6388	<i>Oryzomys xantheolus</i>	Bramaderos	Per.	–	+	<i>T. rangeli</i>

* Capture sites: Dom. = domiciliary, Per. = peridomiciliary.

† LIT = hemoculture in liver infusion tryptose medium.

revealed only *T. lewisi* in the animals that harbored mixed infections, masking the presence of the less abundant *T. cruzi*. In addition, only a handful of studies have focused on trypanosome surveys in commensal rats (*Rattus* spp.) in Latin America (Edgcomb and Johnson, 1970; Herrera and Urdaneta-Morales, 1997; Linardi and Botelho, 2002).

The presence of *T. lewisi* and *T. rangeli* in Ecuador is confirmed for first time by this study. In 1976, *T. rangeli*-like parasites were reported in *Rhodnius ecuadoriensis*, but this observation was not confirmed (D'Alessandro and Saravia, 1992). Our record of 1 infected *O. xantheolus* is the first reported case of infection by *T. rangeli* in the species. Despite its wide distribution and importance, *T. rangeli* had not yet been previously recorded from Ecuador, probably because of the lack of studies on trypanosome reservoir hosts.

In addition to those trypanosome species found in the present study, other species such as *T. conorhini*, *T. freitasi*, *T. leuwenhoekii*, and *T. minasense* as well a number of bat trypanosomes (Hoare, 1972; Ubelaker et al., 1977; de Sousa, 1999) and other previously unidentified species could be infecting mammals in different areas of Ecuador. These species were not found, probably because we restricted the study to populated areas and because we did not use molecular tools to distinguish any trypanosomes other than *T. cruzi*, *T. lewisi*, and *T. rangeli*. Moreover, the morphology of all the trypanosomes examined by direct microscopy on blood slides matched only with 2 species (*T. cruzi* and *T. lewisi*). The identification of *T. rangeli* was done only by PCR, because no trypomastigotes were detected in the stained slides, perhaps owing to the low parasite numbers in the peripheral blood of mammalian hosts (Cuba Cuba, 1998). Morphological and molecular characterization of other species of trypanosomes found in tropical regions is required to have a better understanding of the taxonomy and evolution of the trypanosomes that are infecting different species of mammals (de Sousa, 1999).

Despite that *M. musculus* was the most abundant species collected in this study, we did not find evidence of trypanosome infection in this rodent species. Studies elsewhere in Latin

America have confirmed this observation, e.g., Lainson et al. (1979) in Brazil; Mimori et al. (1985) in Ecuador; and Herrera and Urdaneta-Morales (1997) in Venezuela. Other studies have found few infected individuals, e.g., Pinto et al. (2003) reported only 1 infected mouse with *T. cruzi*. Like *M. musculus*, other kinds of rodents have been reported in the literature with a very low *T. cruzi* prevalence, e.g., the spiny rats, *Proechimys guyannensis*, and *P. semispinosus*, with prevalences of 0.3 and 1.3% in Brazil and Colombia, respectively (Lainson et al., 1979; Travi et al., 1994). Cotton rats, *Sigmodon* spp., have exhibited low prevalence (0.5%) or absence of infection in different surveys in North America, Costa Rica, Brazil, and Venezuela (Eads and Hightower, 1952; Zeledón et al., 1970; Lainson et al., 1979; Telford and Tonn, 1982). None of the *Proechimys* or *Sigmodon* specimens we sampled was infected, perhaps because of the terrestrial habits of these rodents, avoiding a spatial overlapping with the triatomines. Unfortunately, information on trypanosomes, other than *T. cruzi* infecting these Neotropical rodents is not available.

Opossums (*Didelphis* spp.) have been considered the most important reservoirs of *T. cruzi*. Different studies have found levels of prevalence ranging from 13 to 72% (Zeledón et al., 1970; Lainson et al., 1979; Mimori et al., 1985; Travi et al., 1994); however, in the present study, only 1 individual of 33 was positive for *T. cruzi* (3%). In particular, the study by Travi et al. (1994) in neighboring Colombia has shown different results, but it may explain the pattern observed in this and other studies carried out in Ecuador. Travi et al. (1994) reported prevalences of 72% in a tropical forest and 13.63% in a dry forest. These data could indicate a higher prevalence in humid places than in dry places in northern South America, and this difference could explain the lack of trypanosome-positive opossums in Loja. However, despite the high humidity in Guayas, only 1 positive was captured here. This result contrasts greatly with a study carried in Guayas Province (Mimori et al., 1985) and in Manabí Province (northwestern Ecuador) (Pinto et al., 2003), where the prevalences were high, as expected, for humid localities, i.e., 25 and 100%, respectively. Although it is unclear

LITERATURE CITED

- why we found so few positives in Guayas, 1 untested hypothesis relates to the excessive use of insecticides in the rice fields that predominate in this area, causing a decline in the population of triatomines in the study localities of Guayas, and, consequently, decreasing the possibility of transmission of trypanosomes by these insects. This hypothesis is supported by entomological household surveys conducted simultaneously in the studied communities that show a low level of triatomine infestation in households (M. Grijalva, unpubl. obs.).
- In the present study, *R. rattus* was the species with the highest number of infected animals and the only host infected by 2 species of trypanosomes. However, this finding also has a geographic component, since we did not find infection by *T. cruzi* in this species in Guayas Province. In Loja Province, *R. rattus* was shown to be an important reservoir host of *T. cruzi*; this species was shown to exhibit a prevalence of 57% in Panamá (Edcomb and Jonson, 1970) and 30.6% in Costa Rica (Zeledón, 1974). This species is an important reservoir host for *T. cruzi* because of the high number of infected individuals, the high population density achieved, and its sympatric distribution relative to humans.
- Anti-*T. cruzi*-seropositive humans were found in 3.9% of the households sampled in the same communities in Loja Province. The presence of seropositivity was associated with the presence of domiciliated triatomines (Grijalva et al., 2005). This pattern, matches with the prevalence of *T. cruzi* infection in rats in Loja. In contrast, the absence of positive rats might be associated with the low anti-*T. cruzi* seroprevalence (<1%) and the absence of domiciliary or peridomiciliary triatomine infestation in Guayas Province (M. Grijalva, unpubl. obs.).
- In the present study, the methods used to detect trypanosome infections, i.e., direct microscopy and LIT hemoculture, may have underestimated the prevalence of infections owing to their comparatively low sensitivity compared with other methods such as serology, i.e., enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescent antibody test, and molecular techniques, i.e., PCR (Kirchhoff et al., 1996; Yabsley et al., 2001). Limiting factors for increasing the use of these methods such as the availability of species-specific conjugates for serological techniques, and the cost associated with large-scale screening using PCR, limited our ability to test all samples by using these techniques.
- Control campaigns of vector-borne diseases are generally focused on domiciliary insecticide application to reduce vector populations. In Ecuador, however, no efforts have been made to control populations of the rodent reservoirs. From the data reported here and elsewhere, it is clear that *R. rattus* may be an important link in the infection cycle in endemic localities throughout Latin America (Edgcomb and Johnson, 1970; Zeledón, 1974; Herrera and Urdaneta-Morales, 1997). A dual-focused approach, where both vector and reservoir are targeted, may effectively reduce the occurrence of CD in these localities.
- ACKNOWLEDGMENTS**
- We thank Jaime Costales and Mery Anne Wenck for help during the fieldwork; Jorge Salazar for assistance in preparation of this manuscript; Alfred Gardner, Michael Carleton, and Diego Alvarado for aid with the identifications of the mammal species. Financial support was provided by Plan International Ecuador, Ohio University, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, and UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training on Tropical Diseases (TDR A20785).
- AGUILAR, H. M., F. ABAD-FRANCH, J. RACINES-V., AND A. PAUCAR-C. 1999. Epidemiology of Chagas disease in Ecuador. A brief review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **94**(Suppl. 1): 387–393.
- BARR, S. C., C. C. BROWN, V. A. DENNIS, AND T. R. KLEI. 1991. The lesions and prevalence of *Trypanosoma cruzi* in opossums and armadillos from southern Louisiana. *Journal of Parasitology* **77**: 624–627.
- CERÓN, C., R. VALENCIA, W. PALACIOS, AND R. SIERRA. 1999. Las formaciones naturales de la Costa del Ecuador. In *Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador continental*, R. Sierra (ed.). Proyecto INEFAN/GEF-BIRF and Eco-ciencia, Quito, Ecuador, p. 55–78.
- CHIARI, E., J. C. P. DIAS, M. LANA, AND C. A. CHIARI. 1989. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human Chagas' disease in the chronic phase. *Revista de la Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **22**: 19–23.
- CUBA CUBA, C. A. 1998. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Revista de la Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **31**: 207–220.
- D'ALESSANDRO, A., AND G. N. SARAVIA. 1992. *Trypanosoma rangeli*. In *Parasitic protozoa*, 2nd ed., J. P. Kreier and J. R. Baker (eds.). Academic Press, Inc., San Diego, California, p. 1–54.
- DEFRANC-ISSA, M. 1982. *Enfermedad de Chagas*. Editorial Casa de la Cultura Ecuatoriana Núcleo del Guayas, Guayaquil, Ecuador, 277 p.
- DE SOUSA, M. A. 1999. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **94**(Suppl. 1): 205–210.
- DESQUESNES, M., S. RAVEL, AND G. CUNY. 2002. PCR identification of *Trypanosoma lewisi*, a common parasite of laboratory rats. *Kinetoplastid Biology and Disease* **1**: 1–6.
- EADS, R. B., AND B. G. HIGHTOWER. 1952. Blood parasites of southwest Texas rodents. *Journal of Parasitology* **38**: 89–90.
- EDGCOMB, J. H., AND C. M. JOHNSON. 1970. Natural infection of *Rattus rattus* by *Trypanosoma cruzi* in Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **19**: 767–769.
- GRIJALVA, M. J., F. S. PALOMEQUE-RODRÍGUEZ, J. A. COSTALES, S. DAVILA, AND L. ARCOS-TERAN. 2005. High household infestation rates by synanthropic vectors of Chagas disease in Southern Ecuador. *Journal of Medical Entomology* **42**: 68–74.
- HERRERA, L., AND S. URDANETA-MORALES. 1997. Synanthropic rodent reservoirs of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in the valley of Caracas, Venezuela. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **39**: 279–282.
- HOARE, C. 1972. *The trypanosomes of mammals, a zoological monograph*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K., 749 p.
- KIRCHHOFF, L. V., J. R. VOTAVA, D. E. OCHIS, AND D. R. MOSER. 1996. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 1171–1175.
- LAINSON, R., J. J. SHAW, H. FRAIHA, M. A. MILES, AND C. C. DRAPER. 1979. Chagas's disease in the Amazon Basin: I. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Pará, north Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **73**: 193–204.
- LINARDI, P. M., AND J. R. BOTELHO. 2002. Prevalence of *Trypanosoma lewisi* in *Rattus norvegicus* from Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**: 411–414.
- MIMORI, T., M. KAWABATA, E. GÓMEZ, V. VERA DE CORONEL, M. DE AROCA, T. FLOR, AND Y. HASHIGUCHI. 1985. A seroepidemiological survey of Chagas' disease and a search for reservoir hosts in two endemic areas of Ecuador. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **13**: 245–250.
- PINTO, C. M., M. J. GRIJALVA, AND J. A. COSTALES. 2003. Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en roedores y marsupiales en dos localidades de Manabí, Ecuador. *Revista de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador* **71**: 225–233.
- PUNG, O. J., C. W. BANKS, D. N. JONES, AND M. K. KRISSENGER. 1995. *Trypanosoma cruzi* in wild raccoons, opossums, and triatomine bugs in southeast Georgia, U.S.A. *Journal of Parasitology* **81**: 324–326.
- TELFORD, S. R., AND R. J. TONN. 1982. Dinámica de *Tripanosoma* [sic]

- cruzi* en poblaciones de un reservorio primario, *Didelphis marsupialis*, en los llanos altos de Venezuela. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana **93**: 341–364.
- TRAVI, B. L., C. JARAMILLO, J. MONTROYA, I. SEGURA, A. ZEA, A. GONCALVES, AND I. D. VELEZ. 1994. *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Colombia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **50**: 557–565.
- UBELAKER, J. E., R. D. SPECIAN, AND D. W. DUSZYNSKI. 1977. Endoparasites. In Biology of bats of the New World family Phyllostomidae, Part II, R. J. Baker, J. K. Jones Jr., and D. Carter (eds.). Special Publications of The Museum Texas Tech University, Lubbock, Texas, p. 7–56.
- VALENCIA, R., C. CERÓN, W. PALACIOS, AND R. SIERRA. 1999. Las formaciones naturales de la Sierra del Ecuador. In Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de Vegetación para el Ecuador continental, R. Sierra (ed.) Proyecto INEFAN/GEF-BIRF and Eco-ciencia, Quito, Ecuador, p. 79–108.
- VALLEJO, G. A., F. GUHL, E. CHIARI, AND A. M. MACEDO. 1999. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Tropica **72**: 203–212.
- WHO [WORLD HEALTH ORGANIZATION]. 2002. Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee, Technical Report Series No. 905, Geneva, Switzerland, p. 39–40.
- YABSLEY, M. J., G. P. NOBLET, AND O. J. PUNG. 2001. Comparison of serological methods and blood culture for detection of *Trypanosoma cruzi* infection in raccoons (*Procyon lotor*). Journal of Parasitology **87**: 1155–1159.
- ZELEDÓN, R. 1974. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. In Trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas' disease, Ciba Foundation Symposium 20 (new series). Elsevier, Excerpta Medica, Amsterdam, The Netherlands, p. 51–85.
- , G. SOLANO, G. SÁENZ, AND J. C. SWARTZWELDER. 1970. Wild reservoirs of *Trypanosoma cruzi* with special mention of the opossum, *Didelphis marsupialis*, and its role in the epidemiology of Chagas' disease in an endemic area of Costa Rica. Journal of Parasitology **56**: 38.

Anexo 2.

Black, C. L., **Ocaña, S.**, Riner, D., Costales, J. A., Lascano, M. S., Davila, S., Arcos-Terán, L., Seed, R. and Grijalva, M. J. 2007. Household risk factors for *Trypanosoma cruzi* seropositivity in two geographic regions of Ecuador. *Journal of Parasitology* 93 (1): 12–16.

HOUSEHOLD RISK FACTORS FOR *TRYPANOSOMA CRUZI* SEROPOSITIVITY IN TWO GEOGRAPHIC REGIONS OF ECUADOR

Carla L. Black, Sofia Ocaña*, Diana Riner†, Jaime A. Costales†‡, Mauricio S. Lascano*†, Santiago Davila§, Laura Arcos-Teran*, J. Richard Seed, and Mario J. Grijalva*†||

Department of Epidemiology, School of Public Health, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, 27599.
e-mail: grijalva@ohiou.edu

ABSTRACT: Few studies on the relationship between environmental factors and *Trypanosoma cruzi* transmission have been conducted in Ecuador. We conducted a cross-sectional study of household risk factors for *T. cruzi* seropositivity in 2 distinct geographical regions of Ecuador. Exposure information was collected via household surveys, and subjects were tested for serological evidence of *T. cruzi* infection. In total, 3,286 subjects from 997 households were included. In the coastal region, factors associated with seropositivity were living in a house with a palm roof (odds ratio [OR] = 2.63, 95% confidence interval, [1.61, 4.27]), wood walls (OR = 5.75 [2.04, 16.18]), or cane walls (OR = 2.81 [1.31, 6.04]), and the presence of firewood in the peridomicile (OR = 2.48 [1.54, 4.01]). Accumulation of trash outside the home was associated with a reduced risk of seropositivity (OR = 0.25 [0.12, 0.51]). In the Andean region, living in a house with adobe walls was the only factor predictive of *T. cruzi* seropositivity. In conclusion, risk factors for *T. cruzi* transmission in Ecuador varied by geographic region, probably because of differing behavior of the triatomine vector species in each region. An understanding of the transmission dynamics of *T. cruzi* in a particular area is necessary for the development of effective Chagas disease control strategies in those areas.

An estimated 120,000 to 200,000 people in Ecuador are infected with *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, and 25% of the entire population of Ecuador is estimated to be at risk for infection (Aguilar et al., 1999). However, few studies have been conducted to examine the relationship between environmental factors and risk of *T. cruzi* transmission in Ecuador. An understanding of these risk factors is necessary for the development of appropriate intervention strategies in endemic areas of Ecuador. Previous studies from other parts of Latin America have identified housing construction materials and characteristics of the peridomicile area such as accumulation of firewood outside the house and the presence of palm trees as factors associated with both infection with *T. cruzi* and household infestation with the triatomine vectors of *T. cruzi* (Mott et al., 1978; Zeledon and Vargas, 1984; Starr et al., 1991; De Andrade et al., 1995; Greer et al., 1999; Rizzo et al., 2003).

Risk factors for *T. cruzi* transmission in a particular area depend on regional living habits and the behavior of local vector species. The Southern Cone Initiative has achieved success in interrupting transmission of *T. cruzi* in Chile, Uruguay, and parts of Brazil and Argentina through systematic spraying with residual insecticides aimed at eliminating domiciliary populations of *Triatoma infestans*, the insect vector of *T. cruzi* in this region. Unlike *T. infestans*, which is almost strictly domiciliated, the main insect vectors of disease in Ecuador are reported to be *Triatoma dimidiata*, *Triatoma carrioni*, and *Rhodnius ecuadoriensis*, which have been found in domestic, peridomestic, and sylvatic habitats (WHO, 2000; Abad-Franch, 2001). Interventions targeted at controlling domestic vector populations

such as *T. infestans* may not be as effective against other triatomine species.

Ecuador is divided into several unique geographical regions, each with different insect vectors of *T. cruzi*. Risk factors for *T. cruzi* infection may vary in differing parts of the country (Abad-Franch et al., 2001). A recent study from the Amazon region of Ecuador found that *T. cruzi* seropositivity in this area was associated with living in a house with a thatch roof or open wall construction (Grijalva et al., 2003). The aim of the current study is to evaluate the relationship between housing characteristics and *T. cruzi* seropositivity in 2 other geographically distinct regions of Ecuador, the coastal lowlands and the Andean highlands.

MATERIALS AND METHODS

Study population

The study population consisted of all residents of 14 selected communities in rural areas of the Manabí, Guayas, and Loja provinces of Ecuador. Manabí and Guayas are both coastal regions with a tropical climate, whereas Loja has a temperate climate and is located in the Andean highlands of southern Ecuador. To be included in the study, the head of the household to which the subject belonged must have consented to participate in a household interview, and the subject must have attended a study-sponsored medical clinic, established in collaboration with the Ecuadorian Ministry of Health, where a blood sample was drawn for serological testing for *T. cruzi*. All subjects with serological evidence of infection with *T. cruzi* were considered cases, and all subjects without serological evidence of infection with *T. cruzi* served as controls. Subjects were excluded from the analyses in the present study if they did not provide a blood sample or if the blood sample provided was not suitable for serological testing. All study procedures were approved by the Institutional Review Board of Ohio University and the Ethical Committee of Catholic University of Ecuador. Approval for secondary data analysis was granted by the Institutional Review Board of The University of North Carolina School of Public Health.

Serological testing

For all 3 study sites, initial screening was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) by using detergent-extracted *T. cruzi* epimastigote antigens as described previously (Grijalva et al., 1995). The optical density (OD) values of positive and negative controls were analyzed and used to define the limits for seropositivity and seronegativity of the assay. OD values within 2.5 standard deviations (SDs) of the OD average for the positive controls were considered se-

Received 28 March 2006; revised 13 July 2006; accepted 20 July 2006.

* Infectious Disease Research Laboratory, School of Biological Sciences, Pontifical Catholic University of Ecuador, Quito, Ecuador.

† Department of Biomedical Sciences, Tropical Disease Institute, Ohio University College of Osteopathic Medicine, Athens, Ohio 45701.

‡ Present address: Department of Immunology and Infectious Diseases, Harvard School of Public Health, 665 Huntington Avenue, Building 1, Room 817, Boston, Massachusetts 02115.

§ PLAN Internacional, Quito, Ecuador.

|| To whom correspondence should be addressed.

ropositive, and all OD values within 2.5 SDs of the OD average for negative controls were considered negative. Sera previously confirmed as anti-*T. cruzi* seropositive served as positive controls. Samples that did not fulfill the criteria for positive or negative were classified as borderline. Positive and borderline samples were assayed at least 2 more times. Samples that were positive at least 3 times were considered positive. Samples with repeated borderline results were considered negative. All tests were based on a single blood sample.

For samples collected in the Manabí province in 2001, all samples positive by the initial ELISA were confirmed by immunofluorescence at the Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, Georgia). All samples collected in the Loja province in 2002 that were positive by the initial ELISA and approximately 50% of the negative samples were subsequently tested with 2 commercially available ELISA kits (Chagatest ELISA recombinante version 3.0; Wiener Labs, Rosario, Argentina; and Chagas Serum Antibody Detection Assay Microwell ELISA; IVD Research Inc., Carlsbad, California) and a commercial indirect hemagglutination test (Chagatest HAI; Wiener Labs). All samples collected in Guayas province also were tested using Chagatest ELISA recombinante version 3.0 and Chagatest HAI. These tests were performed according to the manufacturers' instructions. Samples from these provinces that were positive by the recombinant ELISA or by at least 2 of the other tests were considered positive.

Analysis of risk factors

Risk factors of interest were the type of material used in the construction of the roof, walls, and floor of the house; the presence of palm trees near the house; and the accumulation of firewood, lumber, rocks and bricks, trash, and organic matter (defined as palm tree leaves, agricultural products, or agricultural refuse) in the peridomicile area. The peridomicile was defined as the area within 20 m of the house. Exposure information was ascertained by trained study personnel who visited each household.

Odds ratios (ORs) and corresponding 95% confidence intervals (CIs) for the associations between *T. cruzi* seropositivity and each exposure were calculated with logistic regression. Generalized estimating equations (GEEs) were used to account for the correlation of individuals within households. GEEs were implemented with the GENMOD procedure in SAS. For instances in which zero cases occurred in 1, or more, exposure categories and thus an OR could not be calculated, differences between exposed and unexposed categories were compared with the Fisher exact test. A *P* value of ≤ 0.05 was considered indicative of a statistical difference between the 2 groups. All analyses were performed using SAS version 8.2 (SAS Institute, Cary, North Carolina).

Because the species of triatomine vectors and their behavior vary by geographic region, we speculated that risk of seropositivity associated with each exposure might differ by geographic region. To test for such an effect modification, an interaction term between exposure and region was included in the logistic regression models for each exposure. Region was dichotomized as "coastal" for the Manabí and Guayas provinces and "highlands" for the province of Loja. Manabí and Guayas are contiguous provinces with the same insect vectors of *T. cruzi* reported from both locations, whereas Loja is geographically distinct with different triatomine vector species. The significance of the interaction term was tested with the Wald test. An α level of 0.10 was considered statistically significant for the presence of interaction.

Significant interactions were detected between geographic region and the variables for firewood and trash in the peridomicile. Although the interaction term between region and rocks/bricks was not statistically significant, the OR for the association between seropositivity and rocks and bricks was on the opposite side of the null for the different geographic regions. Therefore, an interaction term between exposure and region was included in the logistic regression models for all peridomicile exposures. Interactions with region could not be assessed for roof type, wall type, and palm trees because zero cases occurred in the referent categories of these variables in the highland region. Therefore, the logistic regression analyses of these exposures were restricted to subjects in the coastal region. An interaction term could not be included in the model for floor type because of collinearity between flooring materials and geographic region. Separate models with floor type were run for subjects in the coastal and highland regions.

In the coastal region, the OR for the association between seropositivity and roof type was adjusted for floor type and vice versa. Con-

TABLE I. Housing characteristics by province.

Exposure	Manabí (n* = 278)	Loja (n* = 304) n* (%)	Guayas (n* = 415)
Type of roof			
Cement/asbestos/zinc†	181 (66.06)	21 (6.98)	398 (96.36)
Tile	0 (0)	279 (92.69)	0 (0)
Palm	85 (30.80)	1 (0.33)	13 (3.15)
Other	1 (0.36)	0 (0)	2 (0.48)
Type of walls			
Cement	60 (21.82)	48 (15.89)	155 (37.53)
Adobe	0 (0)	235 (77.81)	0 (0)
Wood	9 (3.27)	11 (3.64)	11 (2.66)
Cane	206 (74.91)	7 (2.32)	244 (59.07)
Other	0 (0)	1 (0.33)	3 (0.73)
Type of floor			
Cement/tile/parquet	53 (19.13)	48 (16.00)	105 (25.42)
Wood boards	132 (47.65)	8 (2.67)	227 (54.96)
Cane	75 (27.08)	0 (0)	58 (14.04)
Dirt	17 (6.14)	244 (81.33)	23 (5.57)
Palm trees	153 (57.74)	18 (6.45)	68 (16.46)
Organic matter	64 (24.24)	75 (25.00)	68 (16.46)
Firewood	132 (50.00)	154 (51.33)	86 (20.77)
Rocks and bricks	12 (4.55)	37 (12.33)	60 (14.49)
Trash	34 (12.88)	63 (21.00)	199 (48.07)
Lumber	24 (9.09)	21 (7.00)	61 (14.73)

* n is number of households.

† Asbestos, pleated roofing sheets made of asbestos fibers and cement.

struction material of walls was highly correlated with type of roof and type of floor. Therefore, estimates for wall type were not adjusted for other housing materials due to issues of collinearity.

RESULTS

Subjects from 1,029 (80%) of the 1,293 households in the study areas presented to the medical clinics and were eligible for participation in the study. Twenty-seven percent (1,244) of the 4,530 eligible subjects did not contribute a blood sample and were excluded from further analyses. Approximately 75% of those not contributing a blood sample were children less than 10 yr of age. Therefore, the study population on which this analysis is based consisted of 3,286 subjects from 997 households. The houses of study participants in the coastal region were significantly more likely to have zinc roofs and wood board floors than houses of nonparticipating subjects. Housing characteristics did not differ between participants and nonparticipants in the highland region.

Housing characteristics by province are given in Table I. The majority of houses in Loja were constructed of tile roofs (92.7%), adobe walls (77.8%), and dirt floors (81.3%). Tile roofs and adobe walls were completely absent in the Manabí and Guayas provinces. In the coastal provinces of Manabí and Guayas, the main housing construction materials were zinc or Eternit roofs, cane walls, and wood board floors. Eternit is a roofing material consisting of pleated sheets of asbestos fibers and cement, hereafter referred to as asbestos. In Manabí province, palm roofs (30.8%) and cane floors (27.1%) were also common. Palm trees outside the home were more common in Manabí (57.7%) than in Guayas (16.5%) and Loja (6.5%).

TABLE II. Frequency of cases and non-cases by exposure status and odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) for the association between each exposure and seropositivity in each geographic region.

Exposure	Coastal (73 cases/2,311 noncases)		Highlands (32 cases/870 noncases)	
	No. of cases/noncases	OR (95% CI)	No. of cases/noncases	OR (95% CI)
Type of roof*				
Cement/asbestos/zinc	48/1,911	1	0/67	
Tile	0/0		32/797	
Palm	25/382	2.59 (1.56, 4.31)	0/0	
Type of walls†				
Cement	10/717	1	0/138	
Adobe	0/0		29/715	
Wood	5/63	5.75 (2.04, 16.18)	1/11	
Cane	58/1514	2.81 (1.31, 6.04)	0/0	
Type of floor‡				
Cement/tile/parquet	11/536	1	3/138	1
Wood boards	40/1193	1.48 (0.70, 3.12)	0/24	
Cane	15/441	1.12 (0.48, 2.60)	0/0	
Dirt	7/131	1.71 (0.62, 4.68)	29/703	1.82 (0.55, 6.02)
Palm trees	29/730	1.44 (0.89, 2.33)	0/47	
Organic matter§	13/441	0.87 (0.46, 1.65)	7/204	0.89 (0.33, 2.43)
Firewood§	42/39	2.48 (1.54, 4.01)	14/452	0.70 (0.32, 1.52)
Rocks and bricks§	5/233	0.62 (0.23, 1.70)	6/98	1.79 (0.76, 4.21)
Trash§	8/762	0.25 (0.12, 0.51)	10/185	1.66 (0.69, 3.98)
Lumber§	6/266	0.63 (0.26, 1.54)	2/60	0.85 (0.23, 3.07)

* Coastal estimate adjusted for type of floor.

† Analysis in highlands region excludes 2 cases and 3 controls living in a house with no walls.

‡ Separate analyses for coastal and highland regions; coastal estimate adjusted for type of roof.

§ Model contains interaction term between exposure and region.

Overall, 73 seropositive cases were detected in the coastal region, and 32 cases were detected in the highland region, corresponding to a prevalence of *T. cruzi* seropositivity of 5.7% (59/1,041), 1.0% (14/1,343), and 3.6% (32/902) in the provinces of Manabí, Guayas, and Loja, respectively.

The frequency of cases in each exposure group and the corresponding odds ratios for the association between each household exposure and seropositivity are given in Table II, stratified by region. In the coastal region, factors associated with being seropositive were living in a house with a palm roof (OR = 2.59 [1.56, 4.31]), wood walls (OR = 5.75 [2.04, 16.18]), or cane walls (OR = 2.81 [1.31, 6.04]), and the presence of firewood in the peridomicile area (OR = 2.48 [1.54, 4.01]). Accumulation of trash outside the home was associated with a reduced risk of seropositivity (OR = 0.25 [0.12, 0.51]). The estimates associated with palm roofs and cane walls are very similar (odds ratios of 2.59 and 2.81, respectively). Because these 2 factors are highly correlated and were not controlled for one another in a single model, it cannot be determined whether both are independently associated with seropositivity or whether the observed effect of one of these factors is due to confounding by the other. However, in an analysis restricted to subjects living in households with zinc or asbestos roofs, the relationship between cane walls and seropositivity for *T. cruzi* was similar to that seen in the overall analysis (OR = 2.37 [1.07, 5.28]), suggesting that cane walls are related to seropositivity independently of roof type. An analysis of roofing ma-

terials stratified by wall type was not possible because no houses with cement walls had a palm roof.

In the highlands region, a formal OR could not be calculated for tile or palm roofs, adobe or wood walls, wood board floors, or palm trees because zero cases occurred in the referent categories of these exposure groups. However, the proportion of cases living in houses with adobe walls (27/744) was significantly higher than in households with cement walls (0/138, $P = 0.0154$). The difference was not statistically significant for wood walls or for the comparison between tile roofs and metal roofs ($P = 0.1628$). No characteristics of the peridomicile were strongly associated with *T. cruzi* seropositivity in the highlands region (Table II). Weak positive associations were observed for rocks and bricks (OR = 1.79 [0.76, 4.21]) and trash (OR = 1.66 [0.69, 3.98]), although these estimates are imprecise due to the low number of cases in this region.

DISCUSSION

We found that compared with cement walls, cane and adobe walls in the coastal and highland regions of Ecuador, respectively, were associated with an increased risk of *T. cruzi* seropositivity. Previous studies investigating wall construction and seropositivity failed to find an association (Gurtler et al., 1998; Greer et al., 1999), although a few studies have shown adobe walls to be associated with household infestation of triatomines (Starr et al., 1991). Adobe walls are prone to cracking and provide hiding places and breeding sites for triatomine insect vec-

tors of *T. cruzi*. Wood or cane walls can contain open spaces and perhaps facilitate triatomine infestation through a similar mechanism.

In the coastal provinces, individuals living in a house with a palm thatch roof were almost 3 times as likely to be seropositive for *T. cruzi* as those individuals living in houses with roofs composed of zinc or asbestos. Previous studies reported associations between thatched roofs and *T. cruzi* seropositivity in areas where *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* were the main vectors of transmission (Greer et al., 1999; Rizzo et al., 2003). Sylvatic populations of *R. prolixus* are found in palm trees and are thought to colonize houses via passive transport in the palm leaves used in the construction of thatched roofs (D'Alessandro et al., 1984; WHO, 2000). Sylvatic populations of *Rhodnius ecuadoriensis* have been reported from the Manabí province (Abad-Franch et al., 2001) and could be introduced into thatched roof homes in this area by a similar mechanism. The observed association with palm roofs also could be an artifact resulting from the high correlation between palm roofs and cane walls.

The presence of firewood, junk piles, and agricultural products outside of the house have been reported to be associated with household infestation of triatomines (Zeledon and Vargas, 1984; Enger et al., 2004). Interestingly, we found in the coastal region that accumulation of trash in the peridomicile area was protective against seropositivity to *T. cruzi*. Although the estimates were unstable, the accumulation of organic matter, rocks, and lumber seemed to be protective as well. Only the presence of firewood outside the home was associated with an increased risk of seropositivity. A protective effect against *T. cruzi* infection by any of these items has not been reported in the literature. However, in a previous analysis by our group of a different population from the Manabí province, we found that the accumulation of organic matter outside the house was inversely associated with *T. cruzi* seropositivity (M. Grijalva, unpubl. obs.). Perhaps the presence of these materials in the peridomicile provides sufficient refuge for the triatomines such that they have colonized these habitats rather than the intradomicile. An entomological search conducted in the Manabí province 3 yr after the data for the present study were collected seems to support this hypothesis, because the majority of captured triatomines were found outside of houses in piles of wood and brick, chicken nests, and guinea pig pens (M. Grijalva, unpubl. obs.). The finding that firewood is associated with an increased risk of infection is also consistent with this hypothesis as firewood is brought into the home on a regular basis and could serve to passively transfer the triatomine vectors into the domicile.

The idea that the presence of triatomine habitats in the peridomicile decreases the likelihood of intradomicilliary colonization is not supported by a recent study from Mexico, which reports that junk piles in the yard are associated with intradomicilliary and peridomicilliary infestation by *Triatoma pallidipennis*, whereas agricultural products in the yard were associated with intradomicilliary infestation but not peridomicilliary infestation (Enger et al., 2004).

An additional explanation for the protective effect of trash and other materials in the peridomicile is that these items might attract predators of the triatomine, such as rodents and other small mammals, thereby reducing the triatomine populations.

Alternatively, these small mammals may serve as a food source for the triatomine insects, decreasing the need for the vectors to enter the houses in search of a blood meal and therefore serving as a buffer for intradomicilliary infestation.

Unlike in the coastal provinces, no peridomicile characteristics were strongly associated with *T. cruzi* seropositivity in the highlands region. The difference in risk factors between the regions is probably due to differences in the triatomine vectors. Although *R. ecuadoriensis* is found in both regions, this species is found in sylvatic and domestic habitats in the coastal region, whereas only synanthropic populations of this species have been reported in the Loja province (Abad-Franch et al., 2001; Grijalva et al., 2005). The other main vector of *T. cruzi* in the Loja province, *Triatoma carrioni*, is found only in the Andean region. In contrast to the coastal provinces, in which insects were found mainly in peridomicile areas, entomological searches in the Loja province found triatomines almost exclusively in the intradomicile, with peridomicile populations found only in association with occupied chicken nests. None of the aforementioned peridomicilliary characteristics was associated with household infestation by the triatomine vectors in an entomological survey of the Loja province (Grijalva et al., 2005). Thus, it follows that materials in the peridomicile also would not be associated with *T. cruzi* infection in humans.

In conclusion, we identified several household characteristics that were related to *T. cruzi* seropositivity. Materials used in the construction of houses were associated with seropositivity in both the coastal and highland regions, despite that the specific construction materials used differed by region. Peridomicilliary risk factors varied by geographic region. These differences were probably due to differing behavior of the triatomine vector species in each region. Our findings illustrate that there is no one-size-fits-all control strategy for Chagas disease. An understanding of the way in which humans, vectors, and environmental factors interact to promote the transmission of *T. cruzi* in a particular area is necessary for the development of an effective strategy for eliminating *T. cruzi* transmission in that area. The mainstays of Chagas disease control programs, such as housing improvement and systematic household spraying with residual insecticide, may not be sufficient to achieve interruption of transmission in Ecuador. Interventions here should be supplemented with additional activities such as spraying of peridomicile areas and continued surveillance for recolonization of domestic environments by peridomicile and sylvatic species of triatomine vectors.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the technical assistance by Rosa Chiriboga and Gabriela Cueva, from Catholic University of Ecuador. This study was funded by grants from the World Health Organization Special Programme for Tropical Disease Research and Training (WHO/TDR) (A20785 and A30170), Catholic University of Ecuador, Ohio University, and PLAN Internacional Ecuador.

LITERATURE CITED

- ABAD-FRANCH, F., A. PAUCAR, C. CARPIO, C. A. CUBA CUBA, H. M. AGUILAR, AND M. A. MILES. 2001. Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: Implications for the design of control strategies. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **96**: 611–620.
- AGUILAR, H. M., F. ABAD-FRANCH, J. RACINES, AND A. PAUCAR. 1999.

- Epidemiology of Chagas disease in Ecuador. A brief review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **94**(Suppl 1): 387–393.
- D'ALESSANDRO, A., P. BARRETO, N. SARAVIA, AND M. BARRETO. 1984. Epidemiology of *Trypanosoma cruzi* in the oriental plains of Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **33**: 1084–1095.
- DE ANDRADE, A. L., F. ZICKER, R. M. DE OLIVEIRA, I. G. DA SILVA, S. A. SILVA, S. S. DE ANDRADE, AND C. M. T. MARTELLI. 1995. Evaluation of risk factors for house infestation by *Triatoma infestans* in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **53**: 443–447.
- ENGER, K. S., R. ORDONEZ, M. L. WILSON, AND J. M. RAMSEY. 2004. Evaluation of risk factors for rural infestation by *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Triatominae), a Mexican vector of Chagas disease. *Journal of Medical Entomology* **41**: 760–767.
- GREER, G. J., N. A. NIX, C. CORDON-ROSALES, B. HERNANDEZ, C. M. MACVEAN, AND M. R. POWELL. 1999. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in three rural communities in Guatemala. *Pan American Journal of Public Health* **6**: 110–116.
- GRIJALVA, M. J., L. ESCALANTE, R. A. PAREDES, J. A. COSTALES, A. PADILLA, E. C. ROWLAND, H. M. AGUILAR, AND J. RACINES. 2003. Seroprevalence and risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection in the Amazon region of Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **69**: 380–385.
- , F. S. PALOMEQUE-RODRIGUEZ, J. S. COSTALES, S. DAVILA, AND L. ARCOS-TERAN. 2005. High household infestation rates by synanthropic vectors of Chagas disease in southern Ecuador. *Journal of Medical Entomology* **42**: 68–74.
- , E. C. ROWLAND, M. R. POWELL, T. S. MCCORMICK, AND L. ESCALANTE. 1995. Blood donors in a vector-free zone of Ecuador potentially infected with *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **52**: 360–363.
- GURTLER, R. E., R. CHUIT, M. C. CECERE, M. B. CASTANERA, J. E. COHEN, AND E. L. SEGURA. 1998. Household prevalence of seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in three rural villages in northwest Argentina: Environmental, demographic, and entomologic associations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **59**: 741–749.
- MOTT, K. E., T. M. MUNIZ, J. S. LEHMAN JR., R. HOFF, R. H. MORROW, JR., T. S. DE OLIVEIRA, I. SHERLOCK, AND C. C. DRAPER. 1978. House construction, triatomine distribution, and household distribution of seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural community in northeast Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **27**: 1116–1122.
- RIZZO, N. R., B. A. ARANA, A. DIAZ, C. CORDON-ROSALES, R. E. KLEIN, AND M. R. POWELL. 2003. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection among school-age children in the endemic area of Guatemala. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **68**: 678–682.
- STARR, M. D., J. C. ROJAS, AND R. ZELEDON. 1991. Chagas' disease: Risk factors for house infestation by *Triatoma dimidiata*, the major vector of *Trypanosoma cruzi* in Costa Rica. *American Journal of Epidemiology* **133**: 740–747.
- [WHO] WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2000. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- ZELEDON, R., AND L. G. VARGAS. 1984. The role of dirt floors and of firewood in rural dwellings in the epidemiology of Chagas' disease in Costa Rica. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **33**: 232–235.

Anexo 3.

Black, C. L., **Ocaña-Mayorga, S.**, Riner, D. K., Costales, J. A., Lascano, M. S., Arcos-Terán, L., Preisser, J. S., Seed, J. R. and Grijalva, M. J. 2009. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in rural Ecuador and clustering of seropositivity within households. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81 (6): 1035–1040.

Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in Rural Ecuador and Clustering of Seropositivity within Households

Carla L. Black, Sofía Ocaña-Mayorga, Diana K. Riner, Jaime A. Costales, Mauricio S. Lascano, Laura Arcos-Terán, John S. Preisser, J. Richard Seed, and Mario J. Grijalva*

Department of Epidemiology, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina; Center for Infectious Disease Research, School of Biological Sciences, Pontifical Catholic University of Ecuador, Quito, Ecuador; Tropical Disease Institute, Department of Biomedical Sciences, Ohio University College of Osteopathic Medicine, Athens, Ohio; Department of Biostatistics, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina

Abstract. We performed a cross-sectional study of *Trypanosoma cruzi* seroprevalence in 14 communities in three provinces of Ecuador and estimated the magnitude of the association of seropositive individuals within households. A total of 3,286 subjects from 997 households were included. Seroprevalence was 5.7%, 1.0%, and 3.6% in subjects in the Manabí, Guayas, and Loja provinces, respectively. Seroprevalence increased with increasing age in Manabí and Guayas, whereas in Loja, the highest prevalence occurred in children ≤ 10 years of age. In the coastal provinces, clustering of seropositives within households was not observed after adjustment for other household factors. However, in the Andean province of Loja, the odds of seropositivity were more than two times greater for an individual living in a household with another seropositive person. Our results indicate that transmission of *T. cruzi* is ongoing in Ecuador, although intensity of transmission and mechanisms of interaction between humans and the insect vectors of disease vary between geographic regions.

INTRODUCTION

The presence of human infection with *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, has been documented in Ecuador as early as 1927. During the 1940s and 1950s, new disease foci were reported from the coastal provinces of Guayas, Manabí, and Los Ríos and the Andean provinces of Loja, Azuay, and Bolívar. Today, Guayas and Manabí, along with the coastal province of El Oro, are thought to be the main endemic areas of the country.¹ However, there are no recent reports of population-based studies assessing the current status of *T. cruzi* transmission in these areas. We report the prevalence of *T. cruzi* seropositivity in population-based samples of communities in rural areas of the Manabí, Guayas, and Loja provinces of Ecuador.

Another objective of this study was to estimate the extent to which *T. cruzi* infections cluster within households. In a paper published in 1976, Mott and others² stated “Since transmission of Chagas’ disease largely occurs within households, description and analysis of the characteristics of household clustering of seropositivity to *T. cruzi* are of particular interest.” Knowledge of the extent to which *T. cruzi* clusters within households can provide information about the extent to which an individual’s risk of infection is affected by living in close proximity to another infected person who can serve as a reservoir of *T. cruzi*. Additionally, the persistence of clustering within households after adjustment for other known household risk factors for *T. cruzi* infection may indicate that other as yet unknown factors are involved in the transmission of *T. cruzi* within households. Mott and others² reported significant clustering of *T. cruzi* seropositivity within households but were unable to quantify the degree of clustering or control for the effect of other household factors.² A later analysis by Gurtler and others³ found no effect of clustering after

adjustment for other covariates using a random effects model. Although a random effects model can determine whether the parameter associated with clustering is statistically significant, the parameter itself does not have an easily understandable interpretation in terms of the magnitude of the clustering. We use the technique of alternating logistic regressions (ALRs) introduced by Carey and others⁴ to quantify the degree of clustering of *T. cruzi* infections within households. ALR provides pairwise odds ratios (PORs) of association of the outcome, in this case *T. cruzi* seropositivity, within clusters while also taking into account the dependence of the outcome on individual and cluster-specific covariates. The PORs obtained from ALR are interpreted similarly to conventional ORs, with a POR > 1 indicating an association of seropositivity between individuals within a household. We also show how the POR can be used in the calculation of design effects, which is useful for planning the sample size of future studies in which subjects are sampled in households or other related units.⁴⁻⁶

MATERIALS AND METHODS

Study population. The subjects included in this study were residents of 14 rural communities in the Manabí, Guayas, and Loja provinces of Ecuador (Figure 1). Data were collected between June 2001 and August 2003. Manabí and Guayas are coastal provinces with a tropical climate, whereas Loja is located in the Andean highlands and has a temperate climate. Study personnel visited all households in the selected communities as part of a study of household risk factors for *T. cruzi* transmission. All members of each household were invited to attend study-sponsored medical clinics. All subjects that presented to the medical clinic and donated a blood sample to be tested for serologic evidence of *T. cruzi* infection were included in this study. Informed consent was obtained from all adult participants and parents of minor children. All study procedures were approved by the Institutional Review Boards of Ohio University and Catholic University of Ecuador.

* Address correspondence to Mario J. Grijalva, Tropical Disease Institute, Biomedical Sciences Department, College of Osteopathic Medicine, Ohio University, 331 Irvine Hall, Athens, OH 45701. E-mail: grijalva@ohio.edu

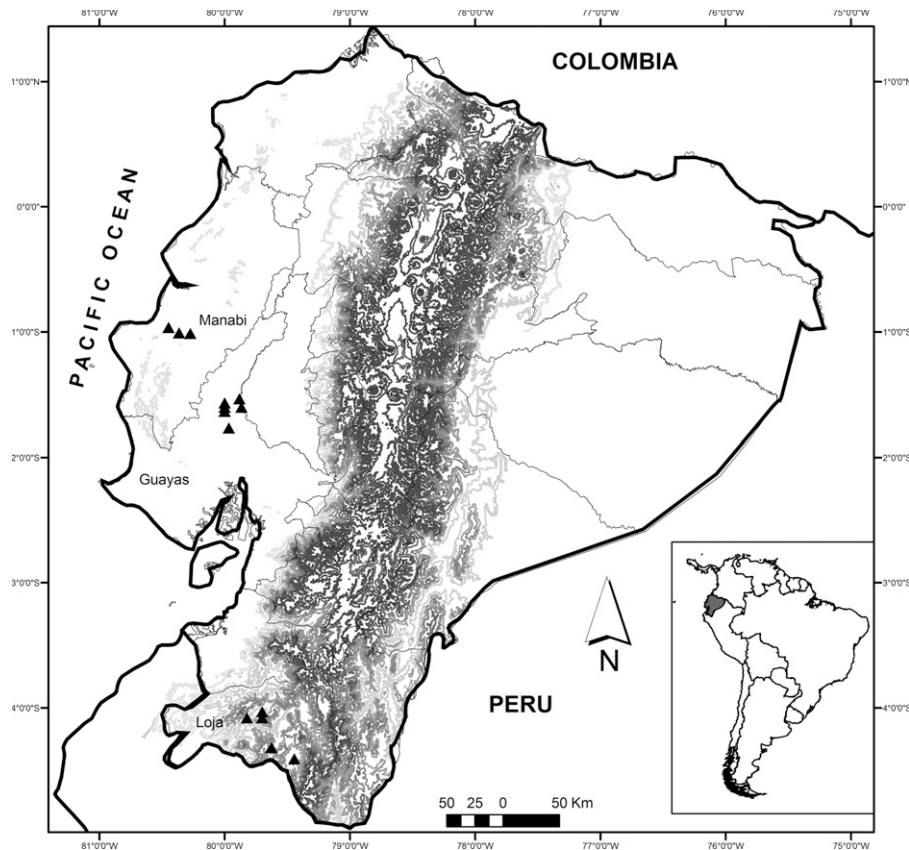


FIGURE 1. Map of Ecuador showing the elevation gradient as a gray scale, the provincial boundaries (solid lines), and the location of the studied communities (triangles).

A total of 4,530 subjects presented to the medical clinics, representing 80% of the eligible households in the study communities; 1,244 subjects were excluded from the analysis because they did not consent to serologic testing, leaving a final sample of 3,286 subjects.

Serologic testing. Blood was collected by venous puncture from all participants. A different serologic testing scheme was used in each of the three study sites. Initial screening in all three sites was performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using detergent-extracted *T. cruzi* epimastigote antigens as previously described.⁷ The optical density (OD) values of previously confirmed positive and negative controls were analyzed and used to define the limits for seropositivity and seronegativity of the assay. OD values within 2.5 SD of the OD average for the positive controls were considered seropositive, and all OD values within 2.5 SD of the OD average for negative controls were considered seronegative. Samples with OD values outside of the range of positive or negative were classified as borderline. Positive and borderline samples were assayed at least two more times. Samples that were positive at least three times were considered positive. Samples with repeated borderline results were considered negative.

For samples collected in the Manabí province, all samples positive by the initial ELISA were confirmed by immunofluorescence at the Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA), with a titer of 1:32 used as the positive cut-off. All samples collected in Guayas province, including those positive and negative by the initial ELISA, were also tested

using a commercially available ELISA kit (Chagatest ELISA recombinante V 3.0; Wiener Laboratories, Rosario, Argentina) and a commercial indirect hemagglutination test (Chagatest HAI; Wiener Laboratories). All samples collected in the Loja province that were positive by the initial ELISA and ~50% of the negative samples were subsequently tested with two commercial ELISA kits (Chagatest ELISA recombinante V 3.0; Wiener Laboratories, and Chagas Serum Antibody Detection Assay Microwell ELISA; IVD Research, Carlsbad, CA) and the Chagatest HAI (Wiener Laboratories). These tests were performed according to the manufacturer's instructions. Samples from Loja and Guayas that were positive by the recombinant ELISA or by at least two of the other tests were considered positive.

Analysis of prevalence. Poisson regression was used to estimate age-specific prevalences and corresponding 95% confidence intervals (CIs) for each province.^{8,9} The log-linear regression model included a linear and a squared variable for age, two indicator variables corresponding to the three provinces, and terms for linear and squared age by province interactions. Age was coded as an ordinal variable ranging from 0 to 7 representing 10-year age categories. Variables for age squared and squared age by province interactions were included to improve model fit. The natural logarithm of the number of subjects in each 10-year age category in each province was included in the model as an offset term to provide a model for the rate of infections as opposed to the count. The fully specified model is shown in supplemental Appendix 1 (available online at www.ajtmh.org).

The variance estimates used in the calculation of CIs were multiplied by the design effect to adjust for possible non-independence of *T. cruzi* infections within households. The design effect is the amount by which the variance of the prevalence estimated under the assumption of simple random sampling must be inflated to account for the clustering of disease. The design effect (D) caused by the correlation of *T. cruzi* seropositivity within households was calculated from the PORs according to the following formula outlined by Katz and Zeger¹⁰:

$$D = 1 + \left(\frac{p_{11} - p^2}{p(1-p)} \right) \left(\left[\frac{m-1}{N} \right] s^2 + \bar{u} - 1 \right)$$

where *p* = prevalence of infection, *m* = the number of households, *N* = the total sample size, \bar{u} = the mean of the household sizes, *s*² = the variance of the household sizes, and *p*₁₁ = the probability that two subjects chosen at random both have disease

$$= \frac{1 - 2p(1-\alpha) - \sqrt{[1 - 2p(1-\alpha)]^2 - 4ap^2(\alpha - 1)}}{2(\alpha - 1)}$$

where α = within-household POR.

Estimation of the PORs is described below. The unadjusted PORs for each region were used in the calculation of the design effects.

Alternating logistic regressions. The magnitude of household clustering of *T. cruzi* seropositivity was estimated in the form of PORs of the association of seropositivity within households. The POR is interpreted as the increased odds in favor of seropositivity for an individual from a household where another individual chosen at random from that household is seropositive relative to the odds in favor of seropositivity if that randomly chosen individual is seronegative.⁵ PORs were estimated with the use of ALRs, as described by Carey and others.⁴ ALRs fit a model for the within-household OR while simultaneously adjusting for the effect of other covariates on the risk of seropositivity. A description of the ALR algorithm is given in supplemental Appendix 2 (available online at www.ajtmh.org).

Separate ALR models were constructed for the coastal provinces, which include Manabí and Guayas, and the Loja province, which is located in the Andean highlands. These two regions are geographically distinct with different insect vectors of *T. cruzi*, and a previous analysis of these data showed that household risk factors for *T. cruzi* differed between the two regions.¹¹ In the previous analysis, type of materials used in the construction of roofs (palm or tile versus metal) and walls (cane or adobe versus cement) of houses were identified as risk factors for *T. cruzi* seropositivity. The presence of firewood and trash in the peridomicile area were additionally associated with seropositivity in the coastal provinces but not in the highlands. These factors were included as adjustment variables in the β model of the ALRs. The resulting final models are shown in supplemental Appendix 2.

ALR analyses were performed with the GENMOD procedure in SAS version 8.2 (SAS, Cary, NC). An exchangeable structure was specified for the POR, assuming constancy across all households.

RESULTS

Prevalence of *T. cruzi* seropositivity. The prevalence of *T. cruzi* seropositivity was 5.7% (59/1041), 1.0% (14/1343), and 3.6% (32/902) in the studied communities of the Manabí, Guayas, and Loja provinces, respectively. Prevalence varied by community within each province (Table 1), ranging from 2.1% to 7.9% in Manabí, 0.6% to 2.0% in Guayas, and 1.2% to 7.2% in Loja.

Model-based age-specific prevalence estimates for each province are shown in Table 2 and Figure 2. In the Manabí province, prevalence increased with increasing age, ranging from 1.5% among children < 10 years of age to a peak of 11.4% in persons 50–59 years of age. Prevalence also increased with age in the Guayas province, from 0.3% among 0–9 year olds to 2.4% in persons \geq 70 years of age. In the province of Loja, the highest prevalence of 7.1% occurred in children < 10 years of age. Prevalence decreased with age until age 30, after which it remained steady at ~2%.

Clustering of *T. cruzi* seropositivity within households. In the coastal provinces of Manabí and Guayas, 73 seropositive subjects were identified from 693 households. Seven of these households had two cases living in the same house. The unadjusted POR for seropositivity within households was 1.42 (95% CI, 0.76, 2.65). The design effect based on this estimate was 1.1. After adjustment for type of roof and the presence of firewood and trash in the peridomicile area, the POR was reduced to 0.97 (0.54, 1.74). A similar estimate of 0.96 (0.52, 1.77) was obtained in a model adjusted for wall type, firewood, and trash. Roof type and wall type were not included in the same model because of co-linearity between the two variables.

In the Loja province, 32 cases were identified in 304 households, with 5 households having 2 cases each. The unadjusted POR was 2.72 (1.18, 6.29), with a corresponding design effect of 1.8. Although housing construction materials were associated with *T. cruzi* seropositivity in the Loja province as well, these variables could not be included as covariates in the ALR model because no seropositive subjects lived in households

TABLE 1
Prevalence of *T. cruzi* seropositivity by community, Ecuador, 2001–2003

Province and community	Number of cases/total sampled	Prevalence (%)
Manabí		
Cruz Alta	42/534	7.87
Pasaje	6/284	2.11
Pimpiguasí	11/223	4.93
Total	59/1,041	5.67
Guayas		
La Alegría	2/289	0.69
Lomas de Colimes	2/220	0.91
Los Angeles	3/175	1.71
Macul	2/337	0.59
Puerto Rico	3/222	1.35
San Antonio	2/100	2.00
Total	14/1,343	1.04
Loja		
Bramaderos	6/173	3.47
Jacapo	9/125	7.20
Naranjo Dulce	9/179	5.03
Pindo Alto	5/173	2.89
Playas	3/252	1.19
Total	32/902	3.55

TABLE 2
Estimated prevalence of *T. cruzi* seropositivity and 95% CIs by geographic region and age category, Ecuador, 2000–2002

Region and age (years)	Number of cases/total sampled	Estimated prevalence* (%) (95% CI)
Manabí		
0–9	3/184	1.45 (0.64, 3.44)
10–19	5/276	2.96 (1.82, 4.81)
20–29	13/159	5.11 (3.58, 7.29)
30–39	9/127	7.67 (5.32, 11.07)
40–49	10/103	10.01 (6.92, 14.48)
50–59	8/83	11.35 (7.96, 16.17)
60–69	6/58	11.18 (7.04, 17.75)
≥ 70	5/42	9.56 (4.32, 21.15)
Guayas		
0–9	1/265	0.33 (0.07, 1.68)
10–19	1/302	0.54 (0.20, 1.45)
20–29	1/214	0.84 (0.40, 1.77)
30–39	1/162	1.20 (0.56, 2.58)
40–49	3/149	1.59 (0.74, 3.44)
50–59	1/118	1.96 (0.96, 4.01)
60–69	3/69	2.24 (0.96, 5.20)
≥ 70	1/64	2.37 (0.59, 9.59)
Loja		
0–9	7/99	7.40 (3.21, 17.09)
10–19	10/243	4.20 (2.42, 7.29)
20–29	4/111	2.77 (1.36, 5.66)
30–39	3/99	2.13 (0.90, 5.09)
40–49	0/84	1.91 (0.78, 4.68)
50–59	2/91	2.00 (0.87, 4.61)
60–69	2/90	2.44 (0.98, 6.04)
≥ 70	3/77	3.45 (0.88, 13.56)

*Prevalence estimated from Poisson loglinear regression.

constructed of cement walls or metal roofs, the referent categories for these variables. All seropositives lived in houses with adobe walls and tile roofs, with the exception of two cases living in a house without walls. An analysis restricted only to subjects from households with tile roofs and adobe or no walls reduced the within household association of *T. cruzi* seropositivity only slightly (POR = 2.39; 1.05, 5.44), indicating that factors other than shared exposure to substandard housing conditions are contributing to the clustering of infections within households. Although the presence of firewood and trash in the peridomicile was not identified as risk factors for seropositivity in the highlands region, a model containing these two variables was run to produce an estimate directly comparable to that from the coastal region. The POR result-

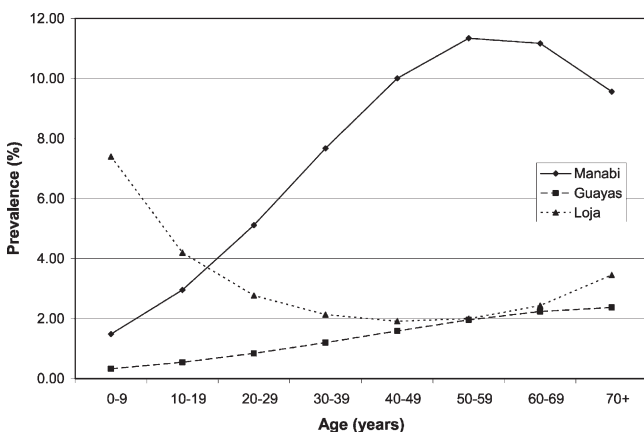


FIGURE 2. Prevalence of *T. cruzi* seropositivity by province and age category, Ecuador, 2001–2003.

ing from this model was 2.51 (1.08, 5.81), also similar to the unadjusted estimate.

DISCUSSION

Our finding of 5.7% overall prevalence of *T. cruzi* seropositivity in the Manabí province is consistent with previous studies, which report seropositivity in various locations in Manabí ranging from 1% to 17%.¹ The pattern of age-specific prevalence is lowest in the youngest ages and steadily increases with increasing age, a pattern that is indicative of a chronic infection that has been endemic in the population for a long period of time. Many previous studies in areas of ongoing endemic *T. cruzi* transmission have shown a proportional increase in prevalence according to age.^{3,12–14} Our results indicate that *T. cruzi* infection remains a significant problem in this region, and there is no evidence of a reduction in transmission over the past 50 years. The continued transmission of *T. cruzi* is also supported by a recent entomologic survey from the same areas of Manabí, which found 21% of households to be infested with triatomine insects capable of serving as vectors of *T. cruzi* (MJ Grijalva, unpublished data).

Like Manabí, the province of Guayas is historically considered to be endemic for *T. cruzi*, with previous estimates of prevalence as high as 24% reported in 1959.¹ We found an overall prevalence in Guayas of 1.0%, an estimate lower than those from previous studies. A trend for increased prevalence with increasing age was observed, suggesting that *T. cruzi* was once endemic in this area. However, the prevalence was very low among those in the youngest age categories (< 1% in all age groups < 30). These results are indicative of a reduction or possible recent interruption of *T. cruzi* transmission in this area. An entomologic survey of 476 households in Guayas conducted in conjunction with this study found evidence of triatomine vectors in only one domicile (MJ Grijalva, unpublished data).

The prevalence of *T. cruzi* infection in the Loja province has not been widely studied. A prevalence rate of 2% from a 1955 survey of schoolchildren is the only previous report from this area that could be found in the medical literature.¹ In this study, we found a prevalence of 7.1% among children < 10 years of age, suggesting that active transmission of *T. cruzi* is occurring in this area. Prevalence did not increase with increasing age as would be expected if *T. cruzi* has been endemic in this area for many years. Conversely, prevalence actually decreased with age in the youngest age groups and remained steady after age 30. This pattern suggests possible recent introduction or re-introduction of *T. cruzi* into this area. A similar result was seen in a recent study by Bowman and others,¹⁵ where prevalence rates were similar in adults and teenagers in an area of Peru where onset of transmission was estimated to have begun 11–12 years before the time of the survey. An entomologic survey conducted concurrently with this study in the same communities of Loja found a household infestation rate by triatomine insects of 35%. The study also found evidence to suggest that the triatomine vectors in this area can colonize human dwellings in a relatively short period of time.¹⁶ This further supports the notion that humans have recently been exposed to triatomine vectors that previously circulated *T. cruzi* in wild ecotopes and have presently become domiciliated.

Because different protocols for serologic testing were used in each province, the actual prevalence estimates are not directly comparable between provinces, although trends across age categories within provinces should be comparable. In the Manabí province, only those samples that were positive by the initial screening test were tested again, and only one additional test was performed on these samples. As such, this was the least sensitive and most specific testing scheme of the three sites, and the reported prevalence from Manabí likely underestimates the true prevalence. The testing scheme used in Guayas was the most sensitive and least specific, because every sample was tested with three separate tests. The true prevalence in the Guayas province was possibly even lower than what we reported.

Our prevalence estimates are also limited by a high non-participation rate. Although persons from 80% of the total households in the study communities reported to the clinics and were thus eligible for inclusion in the survey, we do not have data on the total number of people living in the non-participating households nor the number of the people in the participating households that did not report to the clinics. However, we do know that 75% of the 1,244 subjects that came to the clinics but were excluded from the analysis because of lack of serology were children < 10 years of age. Had these subjects been included in the analysis, the resulting overall prevalence would likely be lower than the reported prevalence in Manabí and Guayas and higher than the reported prevalence in Loja.

In the coastal provinces, the degree of clustering of seropositives within households was small and not statistically significant. The value of the POR became very close to one after adjustment for shared household risk factors for *T. cruzi* infection, indicating that living in the same household as an infected person is not an independent risk factor for *T. cruzi* seropositivity. However, in the Loja province, the risk of seropositivity was more than two times greater if another randomly selected person from the same household was seropositive than if that randomly selected person was seronegative. The difference in household clustering might be explained by different behavior of the triatomine vectors in the two regions. As previously stated, household infestation with triatomine vectors of *T. cruzi* was found in both the Manabí and Loja provinces. In Loja, almost all captured insects were of the species *Rhodnius ecuadoriensis* (98%), with small populations of *Triatoma carrioni* (2%), *Panstrongylus rufotuberculatus* and *Panstrongylus chinai* (one bug each).¹⁶ In Manabí, the majority of captured insects were also *R. ecuadoriensis* (77%), but a sizable population of *Panstrongylus howardi* (22%) and a small number of *P. rufotuberculatus* (0.6%) were also present (MJ Grijalva, unpublished data). However, even though the main vector of *T. cruzi* is the same in both regions, the entomologic situation is quite different. In Loja, bugs were almost exclusively intradomiciliary. Vectors were found in peridomicile areas only in occupied chicken nests.¹⁶ In Manabí, vectors were mainly peridomiciliary. In 64% of infested houses, vectors were found solely in peridomicile areas such as piles of wood and brick and pens of domestic animals, with no bugs present in the intradomicile (MJ Grijalva, unpublished data). Evidence of colonization, indicated by the presence of triatomine eggs and or nymphs, was found in 85% of infested houses in Loja¹⁶ compared with 49% in Manabí (MJ Grijalva, unpublished data).

An analysis of risk factors for *T. cruzi* seropositivity conducted in this same population also supports the notion that differing behavior of triatomine vectors impacts where and how humans become infected. Although construction materials of houses were associated with seropositivity in both regions, peridomicile factors were not associated with seropositivity in Loja, which was expected as triatomine insects were found mainly inside houses. However, in the coastal region, the presence of firewood in the peridomicile increased the risk of seropositivity, possibly because vectors are passively transported into homes along with the firewood or because people are bitten as they carry the wood into their homes. Accumulation of trash and organic matter outside the home was protective against *T. cruzi* seropositivity. While a surprising finding, this could be an indication that vectors have colonized these areas rather than inside the domicile.¹¹

In Manabí, where vectors are more likely peridomiciliary, if humans are being infected outside of the house or by vectors that only sporadically enter the house, an infected person within the house is not likely to serve as a reservoir of *T. cruzi* by which other triatomine insects can become infected. In Loja, where triatomines were found mostly in the intradomicile, humans are probably infected by vectors that have colonized their homes. Once infected, a person serves as a reservoir capable of infecting other insects inside the house, which in turn infect other persons sleeping in close proximity to the index case. Also, the percentage of seropositive individuals with detectable parasitemia has been reported to decline with age.^{17,18} Given the high prevalence of seropositivity among children in Loja, seropositive persons here likely have higher levels of parasitemia than seropositive persons in Manabí and Guayas, who are on average older and may have been infected for several decades. Thus, persons in Loja could be more infective to the triatomine vectors when bitten, and prevalence of *T. cruzi* infection in the vector population is more likely to be associated with human infections here than in the coastal regions, where rodents and domestic animals are probably more important sources of infection for the vectors. Another possible explanation for the observed clustering of seropositivity within households in Loja is that other unmeasured household characteristics are associated with *T. cruzi* transmission in this area.

Based on the PORs, we calculated design effects of 1.1 for the coastal region and 1.8 for Loja province. An estimation of design effects is often important when conducting population-based surveys in developing countries where random sampling is not always feasible and subjects are routinely sampled by households, villages, or other related units. Although the design effect for the coastal region is small because of the low degree of household clustering in this region, a study of *T. cruzi* prevalence in Loja using a household sampling scheme would require a sample almost twice as large as a study design in which subjects were randomly sampled to produce prevalence estimates with equivalent precision. Because design effects are a function of within-cluster correlation, prevalence of disease, and cluster sizes, design effects can vary across studies. Relying on design effects reported from previous studies is not always useful for the planning of future studies. Because PORs are consistent across studies, PORs can be used to calculate design effects and estimate sample sizes for future studies when cluster sizes can be predetermined or predicted by the investigator and expected prevalence of the outcome is known.^{5,10} It should

be noted that unadjusted PORs were used in the calculation of design effects. Even if household clustering of *T. cruzi* cases could be explained by shared household factors or other variables, the phenomenon that cases of *T. cruzi* are more likely to occur in the same household still exists and must be accounted for to produce accurate estimates of prevalence when a study design using household sampling is used.

In conclusion, we found evidence of *T. cruzi* infection in all three studied provinces of Ecuador. Prevalence patterns were suggestive of endemic infection in the Manabí province, reduction in transmission over time in the Guayas province, and recent introduction or re-introduction of transmission in the Loja province. *T. cruzi* infections clustered within households in the Loja province, whereas significant clustering was not observed in the coastal provinces. Differences in clustering between the regions might be caused by differing behavior of the triatomine vectors in each region or might be an indication that other unknown household factors play a role in the transmission of *T. cruzi* in the highlands region.

Received November 12, 2008. Accepted for publication June 25, 2009.

Note: Supplemental Appendices 1 and 2 can be found online at www.ajtmh.org.

Financial support: This study received financial support from the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), PLAN Internacional Ecuador, Ohio University, and Catholic University of Ecuador.

Authors' addresses: Carla L. Black (current address), Center for Tropical and Emerging Global Diseases, University of Georgia, 500 D.W. Brooks Drive, Room 330, Athens, GA 30602, Tel: 706-542-4689, Fax: 706-542-3582, E-mail: blackc@uga.edu. Sofia Ocaña-Mayorga, Center for Infectious Disease, Research School of Biological Sciences, Pontifical Catholic University of Ecuador, Ed. Química Planta Baja #1, Ave. 12 de Octubre y Roca, Quito, Ecuador, Tel: 593-2-2-991700 ext. 1856, Fax: 593-2-299-1687, E-mail: sbocana@puce.edu.ec. Diana K. Riner (current address), Emerging Infectious Diseases, Department of Microbiology and Immunology, Uniformed Services University of the Health Sciences, 4301 Jones Bridge Road, Bethesda, MD 20814, Tel: 301-295-3744, Fax: 301-295-1545, E-mail: diana.riner@usuh.mil. Jaime A. Costales, Center for Infectious Disease, Research School of Biological Sciences, Pontifical Catholic University of Ecuador, Ed. Química Planta Baja #1, Ave. 12 de Octubre y Roca, Quito, Ecuador, Tel: 593-2-2-991700, ext. 1856, Fax: 593-2-299-1687, E-mail: jacostales@puce.edu.ec. Mauricio S. Lascano, Tropical Disease Institute, Biomedical Sciences Department, College of Osteopathic Medicine, Ohio University, 331 Irvine Hall, Athens, OH 45701, Tel: 740-593 2192, Fax: 740-597-2778, E-mail: sl375903@ohio.edu. Laura Arcos-Terán, Center for Infectious Disease Research, School of Biological Sciences, Pontifical Catholic University of Ecuador, Ed. Ciencias 4to piso, Ave. 12 de Octubre y Roca, Quito, Ecuador, Tel: 593-2-2991576, Fax: 593-2-299-1687, E-mail: larcos@puce.edu.ec. John S. Preisser, Department of Biostatistics, School of Public Health, University of North Carolina, 3105-F McGavran-Greenberg Hall, CB# 7420, Chapel Hill, NC 27599, Tel: 919-966-7265, Fax: 919-966-3804, E-mail: jpreisse@bios.unc.edu. J. Richard Seed, Department of Epidemiology, School of Public Health, University of North Carolina, 2103-B McGavran-Greenberg Hall, CB# 7435, Chapel Hill, NC 27599, Tel: 919-966-3527, Fax: 919-966-2089, E-mail: rseed@email.unc.edu. Mario J. Grijalva, Tropical Disease Institute, Biomedical Sciences Department, College of Osteopathic Medicine, Ohio University, 331 Irvine Hall, Athens OH 45701, Tel: 740-593-2192, Fax: 740-597-2778, E-mail: grijalva@ohio.edu.

REFERENCES

1. Aguilar HM, Abad-Franch F, Racines J, Paucar A, 1999. Epidemiology of Chagas disease in Ecuador. A brief review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl 1): 387-393.
2. Mott KE, Lehman JS Jr, Hoff R, Morrow RD, Muniz TM, Sherlock I, Draper CC, Pugliese C, Guimaraes AC, 1976. The epidemiology and household distribution of seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural community in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 25: 552-562.
3. Gurtler RE, Chuit R, Cecere MC, Castanera MB, Cohen JE, Segura EL, 1998. Household prevalence of seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in three rural villages in northwest Argentina: environmental, demographic, and entomologic associations. *Am J Trop Med Hyg* 59: 741-749.
4. Carey V, Zeger SL, Diggle P, 1993. Modeling multivariate binary data with alternating logistic regressions. *Biometrika* 80: 517-526.
5. Katz J, Carey VJ, Zeger SL, Sommer A, 1993. Estimation of design effects and diarrhea clustering within households and villages. *Am J Epidemiol* 138: 994-1006.
6. Preisser JS, Arcury TA, Quandt SA, 2003. Detecting patterns of occupational illness clustering with alternating logistic regressions applied to longitudinal data. *Am J Epidemiol* 158: 495-501.
7. Grijalva MJ, Rowland EC, Powell MR, McCormick TS, Escalante L, 1995. Blood donors in a vector-free zone of Ecuador potentially infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 52: 360-363.
8. Koch GG, Atkinson SS, Stokes ME, 1986. Poisson regression. Kotz S, Johnson NL, eds. *Encyclopedia of Statistical Sciences*. Seventh edition. New York: John Wiley & Sons, 32-41.
9. Stokes ME, Davis CS, Koch GG, 2000. *Categorical Data Analysis Using the SAS System*. Second edition. Cary, NC: SAS Institute.
10. Katz J, Zeger SL, 1994. Estimation of design effects in cluster surveys. *Ann Epidemiol* 4: 295-301.
11. Black CL, Ocaña S, Riner D, Costales JA, Lascano MS, Davila S, Arcos-Teran L, Seed JR, Grijalva MJ, 2007. Household risk factors for *Trypanosoma cruzi* seropositivity in two geographic regions of Ecuador. *J Parasitol* 93: 12-16.
12. Chippaux JP, Postigo JR, Santalla JA, Schneider D, Brutus L, 2008. Epidemiological evaluation of Chagas disease in a rural area of southern Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 578-584.
13. Rizzo NR, Arana BA, Diaz A, Cordon-Rosales C, Klein RE, Powell MR, 2003. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection among school-age children in an endemic area of Guatemala. *Am J Trop Med Hyg* 68: 678-682.
14. de Andrade ALSS, Zicker F, Luquetti AO, Oliveira RM, Silva SA, Souza JMP, Martelli CMT, 1992. Surveillance of *Trypanosoma cruzi* transmission by serological screening of schoolchildren. *Bull World Health Organ* 70: 625-629.
15. Bowman NM, Kawai V, Levy MZ, Cornejo del Carpio JG, Cabrera L, Delgado F, Malaga F, Benzaquen EC, Pinedo VV, Steurer F, Seitz AE, Gilman RH, Bern C, 2008. Chagas disease transmission in periurban communities of Arequipa, Peru. *Clin Infect Dis* 46: 1822-1828.
16. Grijalva MJ, Palomeque-Rodriguez FS, Costales JA, Davila S, Arcos-Teran L, 2005. High household infestation rates by synanthropic vectors of Chagas disease in southern Ecuador. *J Med Entomol* 42: 68-74.
17. Hoff R, Mott KE, Silva JF, Menezes V, Hoff JN, Barrett TV, Sherlock I, 1979. Prevalence of parasitemia and seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural population of northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 28: 461-466.
18. Maguire JH, Mott KE, Hoff R, Guimaraes A, Franca JT, Souza JAA, Ramos NB, Sherlock IA, 1982. A three-year follow-up study of infection with *Trypanosoma cruzi* and electrocardiographic abnormalities in a rural community in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 31: 42-47.

Anexo 4.

Ocaña-Mayorga, S., Llewellyn, M. S., Miles, M. A. and Grijalva, M. J. Sex, subdivision and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Southern Ecuador (enviado a la revista Plos Neglected Tropical Diseases, aceptado con cambios menores)

C I E I

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS

Escuela de Biología

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Quito, 14 de Septiembre de 2010

Declaración de co-autoría

Por medio de la presente declaramos que el estudio “Sex, subdivision and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Southern Ecuador”, del cual somos co-autores formará parte de la tesis doctoral de Sofía B. Ocaña Mayorga, quien hizo una contribución mayor durante las fases de trabajo de campo, análisis y escritura del manuscrito.

Atentamente,



Dr. Mario Grijalva C.

Dr. Jaime Costales C.

London School of Hygiene & Tropical Medicine

(University of London)
Department of Infectious and Tropical Diseases
Keppel Street, London WC1E 7HT

Tel: (Switchboard) +44 (0)20-7636-8636
Tel: (Direct) +44 (0)20-7927-2319
Fax: +44 (0)20-7636-8739
Mobile: 00447986587547
Email: martin.llewellyn@lshtm.ac.uk



Londres, 14 de Septiembre de 2010

Declaración de co-autoría

Por medio de la presente declaramos que el estudio “Sex, subdivision and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Southern Ecuador”, del cual somos co-autores formará parte de la tesis doctoral de Sofía B. Ocaña Mayorga, quien hizo una contribución mayor durante las fases de trabajo de campo, análisis y escritura del manuscrito.

Attentamente,

Dr. Martin Llewellyn Ph.D. M.A. B.A.
LSHTM

Michael A. Miles MSc. PhD. DSc. FRCPath.
Professor of Medical Protozoology

Title page:

RH: OCAÑA-MAYORGA AND OTHERS: *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador

Title:

Sex, Subdivision, and Domestic Dispersal of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador

Authors:

Sofía Ocaña-Mayorga¹, Martin S. Llewellyn², Jaime A. Costales¹, Michael A. Miles², Mario J. Grijalva^{1,3*}

1 Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador; **2** London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kindom; **3** Tropical Disease Institute, Biomedical Sciences Department, College of Osteopathic Medicine, Ohio University, Athens, Ohio, United States of America

Corresponding author:

* Mario J. Grijalva. E-mail: grijalva@ohio.edu

Abstract

Background:

Molecular epidemiology at the community level has an important guiding role in zoonotic disease control programmes where genetic markers are suitably variable to unravel the dynamics of local transmission. We evaluated the molecular diversity of *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, in southern Ecuador (Loja Province). This kinetoplastid parasite has traditionally been a paradigm for clonal population structure in pathogenic organisms. However, the presence of naturally occurring hybrids, mitochondrial introgression, and evidence of genetic exchange in the laboratory question this dogma.

Methodology/Principal Findings

Eighty-one parasite isolates from domiciliary, peridomiciliary, and sylvatic triatomines and mammals were genotyped across 10 variable microsatellite loci. Two discrete parasite populations were defined: one predominantly composed of isolates from domestic and peridomestic foci, and another predominantly composed of isolates from sylvatic foci. Spatial genetic variation was absent from former, suggesting rapid parasite dispersal across our study area. Furthermore, linkage equilibrium between loci, Hardy-Weinberg allele frequencies at individual loci, and a lack of repeated genotypes are indicative of frequent genetic exchange among individuals in the domestic/peridomestic population.

Conclusions/Significance

These data represent novel population-level evidence of an extant capacity for sex among natural cycles of *T. cruzi* transmission. As such they have dramatic implications for our understanding of the fundamental genetics of this parasite. Our data also elucidate local disease transmission, whereby passive anthropogenic domestic mammal and triatomine dispersal across our study area is likely to account for the rapid domestic/peridomestic spread of the parasite. Finally we discuss how this, and the observed subdivision between sympatric sylvatic and domestic/peridomestic foci, can inform efforts at Chagas disease control in Ecuador.

Author summary

Trypanosoma cruzi is transmitted by blood sucking insects known as triatomines. This protozoan parasite commonly infects wild and domestic mammals in South and Central America. However, triatomines also transmit the parasite to people, and human infection with *T. cruzi* is known as Chagas disease, a major public health concern in Latin America. Understanding the complex dynamics of parasite spread between wild and domestic environments is essential to design effective control measures to prevent the spread of Chagas disease. Here we describe *T. cruzi* genetic diversity and population dynamics in southern Ecuador. Our findings indicate that the parasite circulates in two largely independent cycles: one corresponding to the sylvatic environment and one related to the domestic/peridomestic environment. Furthermore, our data indicate that human activity might promote parasite dispersal among communities. This information is the key for the design of control programmes in Southern Ecuador. Finally, we have encountered evidence of a sexual reproductive mode in the domestic *T. cruzi* population, which constitutes a new and intriguing finding with regards to the biology of this parasite.

1 **Introduction**

2 Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is the most important
3 parasitic infection in Latin America (1). An estimated 10 million people carry the
4 infection, while another 90 million live at risk (2). This vector-borne zoonosis causes
5 severely debilitating and potentially deadly disease in more than a third of infected
6 people (3). Mucosal or abrasion contact with the infected faeces of hematophagous
7 triatomine bugs constitutes the major mode of transmission (2).

8 Chagas disease is endemic to several regions in Ecuador, including the warm inter-
9 Andean valleys of the southern province of Loja, where the main vectors are *Rhodnius*
10 *ecuadoriensis*, *Triatoma carrioni*, *Panstrongylus chinai*, and *Panstrongylus*
11 *rufotuberculatus* (4, 5). Loja Province is currently targeted by the Ecuadorian Chagas
12 Disease Control Program. Complementing disease prevention efforts, recent progress has
13 been made in understanding local vector dynamics (5-7). However, parasite molecular
14 epidemiology could also play a role in guiding effective intervention measures.

15 Molecular diversity was first recognised in *T. cruzi* in the early 1970s (8). Six major
16 genetic subdivisions, known as discrete typing units (DTUs), are currently recognized
17 (TcI–TcVI (9)), with distributions loosely defined by geography, transmission cycle, and
18 ecology (1). TcI predominates in northern South America, causes significant human
19 disease (10, 11) and occurs in both domestic and sylvatic cycles of parasite transmission.
20 Of major interest to those planning sustainable control strategies in this region is the
21 extent to which these cycles are connected (12-14). The provision of such data relies on
22 the evaluation of molecular diversity ‘hidden’ at the sub-DTU level (15-17).

23 Hypervariable molecular markers, like microsatellites, have given new and
24 unprecedented insight into the population genetics of other important parasitic zoonoses
25 (18-22). For the first time, specific hypotheses regarding parasite dispersal and
26 reproduction can be addressed. However, the validity of molecular epidemiological data
27 depends heavily on study design. Numerous confounders, including biased sampling
28 (e.g., sampling only one host in a heteroxenous transmission system (23)), population
29 subdivision in both space and time (leading to Wahlund effects (24)), and low sample
30 size all influence the estimation of key population genetic parameters. Historically, such
31 biases have acted as an impediment to obtaining useful epidemiological information from
32 parasite molecular data, and, particularly in *T. cruzi*, to resolving the frequency of sex in
33 natural populations.

34 Here we present microsatellite data for 10 variable loci amplified from a large number of
35 TcI isolates collected from domestic, peridomestic, and sylvatic hosts and vectors in and
36 around several adjacent communities in Loja Province, Ecuador. We evaluate evidence
37 for genetic subdivision between transmission cycles, anthropogenic dispersal of parasites
38 between communities, and panmixia among a subset of strains.

39

40

41 **Methods**

42 **Study area and sampling.** Sixteen communities in Loja Province, southern Ecuador,
43 were sampled (Figure 1). These communities were located at altitudes less than 2,200 m
44 and were representative of the ecological diversity of the province. Trypanosomes were
45 isolated from triatomines and small mammals (rodents and opossums) captured at
46 domestic (within dwellings), peridomestic (near dwellings and/or associated with human
47 activities, e.g., crop stores, chicken roosts, wood and rock piles), and sylvatic (more than
48 20 meters from dwellings) foci (Table S1). Written informed consents from the head of
49 the houses for domiciliary bug searches and capture of mammals near houses were
50 obtained. These documents have been approved by the institutional review board from
51 National Institute of Health (NIH), Ohio University (OU) and Pontifical Catholic
52 University of Ecuador (PUCE). Vertebrates were euthanized to obtain samples; all
53 procedures were carried out in strict accordance with the protocol approved by the Ohio
54 University Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). The Ohio University
55 IACUC adheres to the guidelines in the United States Government Code of Federal
56 Regulations (CFR), Title 9, Chapter 1, Subchapter A- Animal Welfare Parts 1-3 and the
57 United States Health Research Extension Act of 1985, Public Law 99-158 “Animals in
58 Research”.

59 **Molecular identification of *T. cruzi* and lineage genotyping.** Trypanosome species was
60 determined by PCR amplification of the kinetoplast minicircle region as in Vallejo et al.
61 (25). Discrete Typing Units (DTU) genotyping was achieved by assaying a combination
62 of three nuclear loci as described by Lewis et al. (26).

63 **Microsatellite analysis.** Ten previously identified polymorphic microsatellite loci were
64 studied (Table S2) (16). These loci are distributed across seven *T. cruzi* chromosomes
65 and include two groups of physically linked markers (27). Allelic products were
66 amplified using previously described reaction conditions (16). Allele sizes were
67 determined using an automated capillary sequencer (AB3730, Applied Biosystems, UK)
68 in conjunction with a fluorescently tagged size standard and were manually checked for
69 errors. All isolates were typed "blind" to control for user bias. By reference to a
70 representative panel of strains, no cross reactivity was identified between *T. rangeli* and
71 the microsatellite primers used in this study. Population-level genetic diversity was
72 assessed using sample size corrected allelic richness (A_r) in FSTAT 2.9.3.2 (28) and
73 number of private (population specific) alleles per locus (PA). F_{IS} , a measure of the
74 distribution of heterozygosity within and between individuals, was estimated per locus
75 per population in FSTAT 2.9.3.2. F_{IS} can vary between -1 (all loci heterozygous for the
76 same alleles) and +1 (all loci homozygous for different alleles). $F_{IS} = 0$ indicates Hardy-
77 Weinberg allele proportions. The extent of population subdivision between isolates from
78 different transmission cycles was estimated using (F_{ST}) in ARLEQUIN v3.1 and
79 statistical significance assessed via 10,000 random permutations of alleles between
80 populations (29). Similarly, within-population subdivision was examined in ARLEQUIN
81 v3.1, in this case using a hierarchical Analysis of Molecular Variance (AMOVA).
82 Population-level heterozygosity indices were also calculated in ARLEQUIN v3.1 and
83 associated significance levels for p values derived after sequential Bonferroni correction
84 to minimise the likelihood of Type 1 errors (30). Individual-level pair-wise distances
85 were estimated using D_{AS} (1-proportion of shared alleles at all loci / n) (31) under an IAM

86 and $\delta\mu^2$ (32) under an SMM in MICROSAT (33). D_{AS} values form the basis of the
87 dendrogram in Figure 2. To accommodate multi-allelic loci, a script was written in
88 Microsoft Visual Basic to make multiple random diploid re-samplings of each multilocus
89 profile (software available on request). Individual-level genetic distances were calculated
90 as the mean across multiple re-sampled datasets. A Mantel's test for the effect of
91 isolation by distance within populations (pair-wise genetic *vs.* geographic distance) was
92 implemented in Genelax 6 using 10,000 random permutations (34). Linkage
93 disequilibrium indices, pair-wise (R_{GGD}) and multilocus (I_A), were calculated in
94 LINKDOS (35) and MULTILOCUS1.3b (36), respectively. Multiple diploid re-
95 samplings were also made to evaluate the influence of multi-allelic loci on I_A , the results
96 of which are shown in Table 1. Assignment of individuals to populations was made by
97 reference to the topology of the D_{AS} derived tree. Secondly, model-based population
98 assignment was corroborated using STRUCTURE (Figure S1) (37). Sample affiliations
99 are listed in Table S1.

100

101 **Results**

102 Eighty-one isolates of *T. cruzi* were obtained from triatomines and mammals. All were
103 genotyped as TcI. Kinetoplast analysis detected the presence of mixed infection with *T.*
104 *rangeli* in nine isolates from the sylvatic environment (Table S1). In total, a dataset of
105 1,637 alleles was derived across all loci, excluding missing data (Table S3). Multiple (≥ 3)
106 alleles were observed at 3.08% of loci.

107 **Isolate clustering and population subdivision by transmission cycle.** We evaluated
108 patterns of clustering and subdivision among parasite strains in the Loja samples based
109 upon their microsatellite profiles. To identify genetically distinct groups we relied on
110 three lines of evidence: neighbor-joining analysis based on pair-wise genetic distance;
111 model-based population assignment (STRUCTURE); and the statistical significance of
112 the fixation index F_{ST} . The deepest and most robust (56.5%) internal branching within the
113 neighbor-joining tree constructed from pair-wise genetic distance values (D_{AS}) supported
114 the delineation of two populations (Figure 2 and Table 1). No pattern or diversification
115 by host or vector was observed within these populations. The observed bipartite
116 subdivision was unaffected by the presence of multi-allelic loci (100% congruence,
117 Figure 2) and was used as a means to define the populations examined in later analyses
118 (See Table 1). Sample allocation between these two populations was exactly corroborated
119 by the optimal number of clusters (k) derived using STRUCTURE software as defined by
120 Evanno et al. (37) by Δk (Figure S1). One population, henceforth called $LOJA_{Dom/Peri}$,
121 was predominantly composed of isolates from domestic and peridomestic foci, the other,
122 henceforth $LOJA_{Sylv}$, of isolates from the sylvatic environment. Estimates of genetic
123 subdivision (F_{ST}) between *a priori* populations (transmission cycle defined) corroborated

124 this pattern of dispersal. No evidence for subdivision existed between domestic and
125 peridomestic isolates ($F_{ST}= 0.027$, $p = 0.354$), whereas subdivision between these
126 populations (grouped) and sylvatic samples was pronounced ($F_{ST}= 0.212$, $p < 0.0001$).
127 Naturally, reassignment of outliers to their “correct” genetic groups according to
128 neighbor-joining and STRUCTURE analyses further inflated the latter estimate (F_{ST}
129 $LOJA_{Dom/Peri} - LOJA_{Sylv} = 0.397$, $p < 0.0001$). These outliers are evidence for some, albeit
130 limited, parasite dispersal between domestic, peridomestic, and sylvatic transmission
131 cycles as evident in Figure 1 and 2.

132 **Genetic diversity.** Following the identification of two genetically distinct groups of
133 parasite strains circulating in this endemic area, the genetic diversity of each was
134 evaluated and compared. Estimates of allelic richness (A_r) did not demonstrate dramatic
135 difference between $LOJA_{Dom/Peri}$ and $LOJA_{Sylv}$ (Table 1); both populations showed
136 considerable genetic diversity. More private alleles per locus (PA) were found in the
137 larger and marginally more diverse sylvatic population (PA = 2.0; Table 1). In
138 conjunction with its apparent genetic distance from other South American TcI
139 populations (Figure 2), the lack of private alleles within $LOJA_{Dom/Peri}$ (PA= 0.8) suggests
140 diversification of this population from a local source.

141 **Geographic dispersal within populations.** In light of the role played by transmission
142 cycles in structuring the local parasite population, we compared the rate of parasite
143 dispersal within $LOJA_{Dom/Peri}$ with that within $LOJA_{Sylv}$. This rate is inversely proportional
144 to the amount of spatial structure (or isolation by distance (IBD)) in the population.
145 Interestingly, tests for IBD among individuals from $LOJA_{Dom/Peri}$ and $LOJA_{Sylv}$ showed
146 statistically significant and epidemiologically important differences between these two

147 populations. Infinite allele models (IAMs) of microsatellite mutation intrinsically
148 overestimate genetic distances between closely related isolates as compared to stepwise
149 mutational models (SMMs). To circumvent possible bias we chose to test for IBD under
150 both. Strong evidence for spatial structure in *LOJA*_{Sylv} existed regardless ($D_{AS} - R_{XY} =$
151 $0.265, P < 0.0001$; $\delta\mu^2 - R_{XY} = 0.177, p = 0.001$). Among isolates from *LOJA*_{Dom/Peri}, no
152 spatial structure was evident from either measure ($D_{AS} - R_{XY} = 0.100, p = 0.164$; $\delta\mu^2 -$
153 $R_{XY} = -0.05, p = 0.384$). Results are summarised in Figure 3 and strongly suggest more
154 rapid parasite dispersal among domestic and peridomestic foci than that occurring
155 between sylvatic locales at the same spatial scale.

156 **Compelling evidence for sex in *LOJA*_{Dom/Peri}.** Several approaches were employed to
157 estimate the rate of genetic recombination within the parasite populations identified in
158 Loja. Multiple indicators suggested frequent sex among trypanosomes of *LOJA*_{Dom/Peri}.
159 Pair-wise inter-locus linkage (R_{GGD}) was infrequent (5.5%; Table 1) even among
160 physically linked loci (3/4 physically linked locus pairs, those on the same chromosome,
161 were not statistically linked) and despite abundant allelic diversity available within this
162 population for inter-correlation (the statistical power of R_{GGD} drops dramatically with
163 decreasing population-level genetic diversity). Infrequent pair-wise linkage is consistent
164 with the lack of significance attributable to the index of association (I_A) (median $p = 0.13,$
165 $P \geq 0.05$ in 89% of 1000 resampled diploid datasets; Table 1), and with the null
166 hypothesis of random mating that must be assumed. Additionally, tests for deficit or
167 excess of heterozygosity in this population showed no significant deviation from Hardy-
168 Weinberg expectations, reflected by mean values for the inbreeding coefficient (F_{IS})
169 across loci that approximate zero (Table 1). Finally, repeated multilocus genotypes,

170 indicative of clonal reproduction, were absent from this population while present in
171 *LOJA_{Sylv}*. Other aspects of *LOJA_{Sylv}* diversity pointed to predominant clonality, especially
172 strong pair-wise (38.5% of locus pairs) and multilocus linkage ($I_A P < 0.001$) in all
173 diploid resampled datasets (Table 1), but also strong deviation from Hardy-Weinberg
174 levels of heterozygosity under all three measures employed (Table 1). Consistent with
175 spatial structure identified in this population, however, an AMOVA conducted across
176 isolates from San Jacinto and Bramaderos, which make up the majority of *LOJA_{Sylv}*
177 strains (Figure 1 and Table S1), did demonstrate significant but weak F_{ST} ($F_{ST} = 0.173$, P
178 < 0.0001 , 16,000 permutations), evidence that a Wahlund effect could be depressing
179 heterozygosity. Correspondingly, estimates of linkage disequilibrium might also be
180 somewhat inflated by subdivision in this population (38), and it is difficult to reject the
181 possibility that recombination may occur in the sylvatic populations at a micro-
182 geographic scale.

183

184 **Discussion**

185 This study constitutes a first attempt to understand the population dynamics of *T. cruzi* at
186 a local scale using high-resolution molecular markers. The sample includes isolates from
187 different transmission cycles, vectors, hosts, and adjacent communities. This arrangement
188 aims to minimise sample bias and maximise the resulting molecular epidemiological
189 inference. However, all field studies are affected by the natural abundance of hosts and
190 vectors in different transmission cycles, and we cannot claim a perfect dataset.
191 Nonetheless, we can report strong evidence for parasite diversification by transmission
192 cycle, human involvement in parasite dispersal, and the possibility of sex in one parasite
193 population.

194 The presence of the *T. cruzi* lineage I in southern Ecuador is consistent with reports of this
195 DTU throughout northern South America (10, 39, 40). In our study, as in other studies,
196 sub-DTU level diversity of the parasite occurred independently of vector and host (16,
197 17, 41). Instead, we found evidence that transmission cycle (domestic, peridomestic, or
198 sylvatic) is likely to be the major driver behind parasite differentiation, apparently a
199 phenomenon common to *T. cruzi* populations across much of northern South America
200 (15, 16) but never before studied on a local scale. On the basis of our data, we suggest
201 that widespread, internationally distributed TcI subgroups associated with specific
202 transmission cycles may not exist. A lack of connectivity between $LOJA_{Dom/Peri}$ and
203 domestic TcI from Venezuela, VEN_{Dom} , (Figure 2) exemplifies this. Furthermore, clear
204 cross-propagation of parasites between transmission cycles (Figure 2) and few private
205 alleles in $LOJA_{Dom/Peri}$ (Table 1) suggests that these domestic groups are likely to emerge
206 and diversify from local sylvatic sources.

207 *T. cruzi* is the only stercorarian trypanosome of medical importance (42). Natural
208 transmission efficiency by this route (contamination with vector feces) is very low. The
209 rate of transmission from infected *Triatoma infestans* to humans in Argentina, for
210 example, is estimated at approximately one in 650 bites (43). As with *R. prolixus* in
211 Venezuela (14), *R. ecuadoriensis*, a major disease vector in Loja, occurs at high
212 frequency in both domestic and sylvatic locales (7). Our data suggest that even if vector
213 invasion from sylvatic foci is common, as in Venezuela (14), associated transmission of
214 parasites to domestic foci is too infrequent to break up population subdivision. Where
215 cross-propagation does occur, circumstantial evidence incriminates synanthropic
216 mammals as the link between transmission cycles. *Didelphis marsupialis* infected with
217 parasites from the *LOJA*_{Dom/Peri} group were found at both peridomestic (isolate numbers
218 (IN) 6 and 17, Figure 2) and sylvatic (IN 9 and 13, Figure 2) locales. Furthermore, a *R.*
219 *rattus* individual captured at a peridomestic site was found infected with a *LOJA*_{Sylv} strain
220 (IN 31, Figure 2). Finally *P. chinai* and *T. carrioni* adults and nymphs, so far thought to
221 be exclusively domestic and peridomestic triatomine species in Loja (IN 27, 28, 58, 81
222 and 68, Figure 2) (5), were found infected with a *LOJA*_{Sylv} strain, likely as a result of
223 contact with invasive sylvatic mammals. This blurring of the lines between transmission
224 cycles is likely to mirror local environmental change, where human activity is driving
225 land-use transformation.

226 Parasite sampling in Loja was undertaken across an area only 50 km in radius (Figure 1).
227 However, this area encompassed several ecological zones punctuated by high mountains
228 (>2,500 m in elevation) and deep interconnecting valleys. Spatial genetic diversification
229 among sylvatic isolates is an expected outcome given such barriers to host and vector

230 migration (Figure 1 and 3). Conversely, parasites belonging to the *LOJA*_{Dom/Peri} group
231 lack this signature, a finding possibly linked to rapid anthropogenic dispersal in the form
232 of infected individuals, livestock, or passively transported vectors and/or small
233 peridomestic mammals.

234 *T. cruzi* has, until recently, been a paradigm for clonal population structure in pathogenic
235 organisms (44, 45). However, the presence of naturally occurring hybrids (46),
236 mitochondrial introgression (46), and a capacity for genetic exchange in the laboratory
237 (47) has challenged this dogma. The frequent observation of linkage disequilibrium in *T.*
238 *cruzi* may partially stem from cryptic population subdivision (temporal, spatial, and/or
239 genetic) to which linkage statistics are intrinsically sensitive (38). Frustratingly, if
240 assignment software with intrinsic Hardy-Weinberg assumptions (e.g., STRUCTURE
241 (48) or BAPS (49)) is used to account for subdivision prior to linkage analysis, the
242 resulting populations will be sorted to maximise adherence to Hardy-Weinberg allelic
243 frequencies, with artifactual sexuality a possible result (21, 50). Fortunately, in our study,
244 the status of *LOJA*_{Dom/Peri} as a stable deme is corroborated by distance-based, model-free
245 assignment, as well as STRUCTURE. In conjunction with Hardy-Weinberg allele
246 frequencies at individual loci, we consider, therefore, that linkage equilibrium among
247 isolates from *LOJA*_{Dom/Peri} represents strong evidence for frequent genetic exchange
248 among field isolates of *T. cruzi*. We believe that the relatively small sample size of
249 *LOJA*_{Dom/Peri} (n=18) does not affect this conclusion, partly due to the ample genetic
250 diversity present in this population, but also because the lack of spatial subdivision in this
251 group suggests frequent contact and mixis. Thus it constitutes exactly the group of strains
252 between which genetic exchange might be expected to occur. We cannot rule out the

253 possibility that genetic exchange may also occur in the sylvatic cycle, if the role that
254 substructure found in $LOJA_{Sylv}$ played in inflating linkage statistics I_A and R_{GGD} could be
255 taken into account. However, more focused high-density sample collection from multiple
256 individual localities would be required to address such a hypothesis. Furthermore, we
257 cannot infer the cellular mechanism of genetic recombination events on the basis of these
258 data. Hardy-Weinberg allelic allelic frequencies are consistent with classical meiosis.
259 However, the lack of haploid life stages so far observed in *T. cruzi* are not consistent with
260 classical meiosis, nor are the genetic exchange events so far observed *in vitro* (47).

261 Molecular epidemiology at this scale has an important guiding role to play in Chagas
262 disease control programmes. Future efforts in Loja province must account for inter-
263 domiciliary and inter-community parasite dispersal. This includes sustained surveillance
264 and coordinated region-wide spraying campaigns to eliminate local vector re-invasion
265 sources and community education to target passive triatomine dispersal routes. It is also
266 clear that the role of synanthropic mammals cannot be overlooked as these represent an
267 important potential link between sylvatic and domestic foci.

268 We have shown that microsatellite markers, adequate sample sizes, and associated
269 population statistics give fundamental insight into the genetic exchange in *T. cruzi*. Our
270 results, skewed toward samples from the vector, intuitively imply that the vector may be
271 a site of genetic exchange, as is the case for *T. brucei* (51) and *Leishmania major*
272 (52). The data also indicate, not surprisingly, that the majority of events probably occur
273 within a *T. cruzi* lineage between epidemiologically linked strains, and these events have
274 therefore historically been difficult to detect. The intriguing mechanisms of genetic

275 exchange in *T. cruzi* warrant further investigation of their functional, adaptive, and
276 epidemiological significance.

277 **Acknowledgments**

278 Special thanks to Michael Lewis, Matthew Yeo and Michael Gaunt from the London
279 School of Hygiene and Tropical Medicine, John Rivett-Carnac of Chorus Consulting,
280 Danette Pratt from Ohio University, Alejandra Zurita, Josselyn García, Anita Villacís,
281 Esteban Baus and César Yumiseva from Centro de Investigación en Enfermedades
282 Infecciosas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, for technical assistance, and to
283 the field personnel from the Programa Nacional de Control y Vigilancia de la
284 Enfermedad de Chagas en Ecuador.

285

286

287 **References**

288

- 289 1. Miles MA, et al. (2009) The molecular epidemiology and phylogeography of
290 *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the
291 future. *Parasitology* 136:1509-1528.
- 292 2. Coura JR, Dias JC (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas
293 disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1:31-40.
- 294 3. Moncayo A, Silveira AC (2009) Current epidemiological trends for Chagas
295 disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and
296 health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1:17-30.
- 297 4. Aguilar H, Abad-Franch F, Racines V, Paucar A (1999) Epidemiology of Chagas
298 Disease in Ecuador. A brief review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:387-393.
- 299 5. Grijalva MJ, et al. (2005) High household infestation rates by synanthropic
300 vectors of Chagas disease in southern Ecuador. *J Med Entomol* 42:68-74.
- 301 6. Pinto CM, Ocana-Mayorga S, Lascano MS, Grijalva MJ (2006) Infection by
302 trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in
303 Ecuador. *J Parasitol* 92:1251-1255.
- 304 7. Grijalva MJ, Villacis AG (2009) Presence of *Rhodnius ecuadoriensis* in sylvatic
305 habitats in the southern highlands (Loja Province) of Ecuador. *J Med Entomol*
306 46:708-711.
- 307 8. Miles M, Toye P, Oswald S, Godfrey D (1977) The identification by isoenzyme
308 patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating
309 independently in a rural area of Brazil. *Transactions of the Royal Society for*
310 *Tropical Medicine and Hygiene* 71:217-225.
- 311 9. Zingales B, et al. (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific
312 nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst*
313 *Oswaldo Cruz* 104:1051-1054.
- 314 10. Anez N, et al. (2004) Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi*
315 isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas'
316 disease. *Trop Med Int Health* 9:1319-1326.
- 317 11. Zafra G, et al. (2008) Evidence of *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombian
318 chagasic patients. *Parasitol Res* 103:731-734.
- 319 12. Guhl F (2007) Chagas disease in Andean countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102
320 Suppl 1:29-38.
- 321 13. Sanchez-Martin MJ, Feliciangeli MD, Campbell-Lendrum D, Davies CR (2006)
322 Could the Chagas disease elimination programme in Venezuela be compromised
323 by reinvasion of houses by sylvatic *Rhodnius prolixus* bug populations? *Trop*
324 *Med Int Health* 11:1585-1593.
- 325 14. Fitzpatrick S, et al. (2008) Molecular Genetics Reveal That Sylvatic *Rhodnius*
326 *prolixus* Do Colonise Rural Houses. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e210.
- 327 15. Herrera C, et al. (2007) Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes
328 from different geographic regions in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*
329 7:535-539.

- 330 16. Llewellyn MS, et al. (2009) Genome-scale multilocus microsatellite typing of
331 *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and
332 specific genotypes linked to human infection. PLoS Pathog 5:e1000410.
- 333 17. Llewellyn MS, et al. (2009) *Trypanosoma cruzi* IIc: Phylogenetic and
334 Phylogeographic Insights from Sequence and Microsatellite Analysis and
335 Potential Impact on Emergent Chagas Disease. PLoS Negl Trop Dis 3:e510.
- 336 18. Koffi M, et al. (2009) Population genetics of *Trypanosoma brucei gambiense*, the
337 agent of sleeping sickness in Western Africa. Proc Natl Acad Sci U S A 106:209-
338 214.
- 339 19. Kuhls K, et al. (2008) Differentiation and Gene Flow among European
340 Populations of *Leishmania infantum* MON-1. PLoS Negl Trop Dis 2:e261.
- 341 20. Rougeron V, et al. (2009) Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. Proc
342 Natl Acad Sci U S A 106:10224-10229.
- 343 21. Morrison LJ, et al. (2009) Discovery of mating in the major African livestock
344 pathogen *Trypanosoma congolense*. PLoS One 4:e5564.
- 345 22. MacLeod A, et al. (2000) Minisatellite marker analysis of *Trypanosoma brucei*:
346 reconciliation of clonal, panmictic, and epidemic population genetic structures.
347 Proc Natl Acad Sci U S A 97:13442-13447.
- 348 23. Criscione CD, Poulin R, Blouin MS (2005) Molecular ecology of parasites:
349 elucidating ecological and microevolutionary processes. Mol Ecol 14:2247-2257.
- 350 24. De Meeus T, Lehmann L, Balloux F (2006) Molecular epidemiology of clonal
351 diploids: a quick overview and a short DIY (do it yourself) notice. Infect Genet
352 Evol 6:163-170.
- 353 25. Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM (1999) Species specific detection of
354 *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by
355 polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta
356 Trop 72:203-212.
- 357 26. Lewis MD, et al. (2009) Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection
358 of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. Am J
359 Trop Med Hyg 81:1041-1049.
- 360 27. Weatherly DB, Boehlke C, Tarleton RL (2009) Chromosome level assembly of
361 the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. BMC Genomics 10:255.
- 362 28. Goudet J (1995) FSTAT Version 1.2: a computer program to calculate F-
363 statistics. J Heredity 86:485-486.
- 364 29. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated
365 software package for population genetics data analysis. . Evolutionary
366 Bioinformatics Online 1:47-50.
- 367 30. Rice W (1989) Analysing tables of statistical tests. Evolution 43:223-225.
- 368 31. Stephens JC, Gilbert DA, Yuhki N, O'Brien SJ (1992) Estimation of
369 heterozygosity for single-probe multilocus DNA fingerprints. Mol Biol Evol
370 9:729-743.
- 371 32. Goldstein DB, Ruiz Linares A, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW (1995) Genetic
372 absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. Proc
373 Natl Acad Sci U S A 92:6723-6727.
- 374 33. Minch E, et al. (1995) MICROSAT- The Microsatellite Distance Program
375 (Stanford University Press, Stanford).

- 376 34. Peakall R, Smouse P (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population
377 genetic software for teaching and research. . Molecular Ecology Notes 6:288-295.
- 378 35. Garnier-Gere P, Dillmann C (1992) A computer program for testing pairwise
379 linkage disequilibria in subdivided populations. J Hered 83:239.
- 380 36. Agapow PM, Burt A (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium.
381 Molecular Ecology Notes 1:101-102.
- 382 37. Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of
383 individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol
384 14:2611-2620.
- 385 38. Maynard Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG (1993) How Clonal are
386 Bacteria? Proceedings of the National Academy of Sciences 90:4384-4388.
- 387 39. Mejia-Jaramillo AM, Pena VH, Triana-Chavez O (2009) *Trypanosoma cruzi*:
388 Biological characterization of lineages I and II supports the predominance of
389 lineage I in Colombia. Exp Parasitol 121:83-91.
- 390 40. Carrasco HJ, et al. (2005) Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida:
391 Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera:
392 Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States,
393 Venezuela. Int J Parasitol 35:1379-1384.
- 394 41. Spotorno OA, Córdova L, Solari IA (2008) Differentiation of *Trypanosoma cruzi*
395 I subgroups through characterization of cytochrome b gene sequences. Infection,
396 Genetics and Evolution 8:898-900.
- 397 42. Hoare CA (1972) The trypanosomes of mammals (Blackwell Scientific
398 Publications).
- 399 43. Rabinovich JE, Wisnivesky-Colli C, Solarz ND, Gurtler RE (1990) Probability of
400 transmission of Chagas disease by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in
401 an endemic area of Santiago del Estero, Argentina. Bull World Health Organ
402 68:737-746.
- 403 44. Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala F (1990) A Clonal Theory of Parasitic Protozoa:
404 The Population Structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*,
405 *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their Medical and Taxonomical
406 Consequences. Proc Natl Acad Sci U S A 87:2414-2418.
- 407 45. Tibayrenc M, Ayala FJ (2002) The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years
408 on. Trends Parasitol 18:405-410.
- 409 46. Machado CA, Ayala FJ (2001) Nucleotide sequences provide evidence of genetic
410 exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad
411 Sci U S A 98:7396-7401.
- 412 47. Gaunt MW, et al. (2003) Mechanism of genetic exchange in American
413 trypanosomes. Nature 421:936-939.
- 414 48. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure
415 using multilocus genotype data. Genetics 155:945-959.
- 416 49. Corander J, Waldmann P, Sillanpaa MJ (2003) Bayesian analysis of genetic
417 differentiation between populations. Genetics 163:367-374.
- 418 50. Holzmüller P, Herder S, Cuny G, De Mees T (2009) From clonal to sexual: a
419 step in *T. congolense* evolution? Trends Parasitol 26:56-60.
- 420 51. Gibson W, Stevens J (1999) Genetic exchange in the trypanosomatidae. Adv
421 Parasitol 43:1-46.

- 422 52. Akopyants NS, et al. (2009) Demonstration of genetic exchange during cyclical
423 development of *Leishmania* in the sand fly vector. Science 324:265-268.
424
425
426

427 **Figure legends**

428 **Figure 1. Distribution of genotypes in communities and transmission cycles in Loja**

429 **Province.** Black dots indicate locations from which isolates were obtained. Colored

430 circles indicate proportion of *LOJA*_{Sylv} (green) and *LOJA*_{Dom/Peri} (red) genotypes (see

431 Figure 2) among *T. cruzi* isolates from foci designated as sylvatic (S) or

432 domestic/peridomestic (D/P). Crossed circles indicate absence of isolates from a

433 particular location. The area of each pie chart represents the number of samples.

434 *LOJA*_{Dom/Peri} is more common among D/P foci, largely irrespective of community.

435 However, some cross-propagation between transmission cycles is evident. Insert shows in

436 gray the location of Loja province within Ecuador and of Ecuador within South America.

437

438 **Figure 2. Neighbor-joining tree based on D_{AS} values from 10 microsatellite loci.**

439 Continental-scale affiliations of Loja TcI strains are shown in the insert figure and the

440 local subdivision between transmission cycles is shown in the main figure. *T. cruzi* D_{AS}

441 values correspond to the mean of 1,000 random diploid re-samplings of the dataset. Solid

442 grey triangles indicate samples from other regions of South America while colored

443 triangles indicate Ecuadorian populations (*LOJA*_{Dom/Peri} and *LOJA*_{Sylv}). Branch color

444 codes indicate capture environment. Blue: domicile; Red: peridomicile; Green: sylvatic.

445 Sample codes were defined as follows: M: mammal; Dm: *Didelphis marsupialis*; Rr:

446 *Rattus rattus*; Ss: *Sciureus stramineus*; V: vector; Pc: *Panstrongylus chinai*; Tc: *Triatoma*

447 *carrioni*; Re: *Rhodnius ecuadoriensis*; A: adult; N: nymph. Values in italics correspond

448 to bootstraps (%) over 10,000 trees drawn from 100 randomly sampled diploid datasets.

449 Values in bold correspond to topological stability (percentage congruent trees) over 1,000
450 randomly sampled diploid datasets (see *Methods*).

451

452 **Figure 3. Spatial genetic analysis among *T. cruzi* isolates from $LOJA_{Sylv}$ and**
453 **$LOJA_{Dom/Peri}$.** A spatial structure was evident within $LOJA_{Sylv}$ isolates, while no spatial
454 genetic structure was found among $LOJA_{Dom/Peri}$ isolates. Genetic (D_{AS}) and geographic
455 (km) distance were compared. Closed circles and line correspond to samples from
456 $LOJA_{Sylv}$ ($R_{XY} = 0.265$, $p = 0.000$; Slope = 0.0015 ± 0.0001 (SE)); open circles and
457 dashed line correspond to samples from $LOJA_{Dom/Peri}$ ($R_{XY} = 0.100$, $p = 0.164$; Slope =
458 0.0004 ± 0.0004 (SE)). Equivalent statistics under $\delta\mu^2$ are $LOJA_{Sylv}$ $R_{XY} = 0.177$, $p =$
459 0.001 ; $LOJA_{Dom/Peri}$ $R_{XY} = -0.052$, $p = 0.384$.

460

461

462

Table 1. Population genetic parameters for domestic/peridomestic and sylvatic populations of *T. cruzi* in Loja Province, Ecuador

Population	G/N	PL	PA	MA/S	A _r ± SE	H _o *	H _E *	% PL H _E **	% PL H _b †	F _{IS} ± SE††	I _A ‡	Median I _A P-value‡	% PL PLD‡‡
Domestic/Peridomestic	18/18	9	0.8	0.67	3.851 ± 0.527	0.478	0.478	0	0	0.003 ± 0.084	0.170	0.13	5.5
Sylvatic	55/63	9	2.0	0.24	4.583 ± 0.504	0.367	0.457	11.1	44.4	0.184 ± 0.098	0.562	< 0.001	38.5

N = Number of isolates in population.

G = Number of multilocus genotypes per population.

PL= Number of polymorphic loci.

PA= Mean number of private alleles per locus.

MA/S = Mean number of multiple (3+) alleles per sample

A_r = Allelic richness as a mean over loci ± standard error, calculated in FSTAT (28)

*Mean observed and expected heterozygosity across all loci, calculated in ARLEQUIN v3.1 (29)

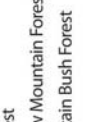
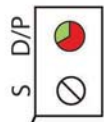
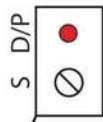
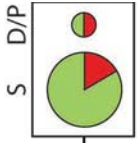
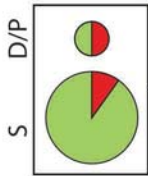
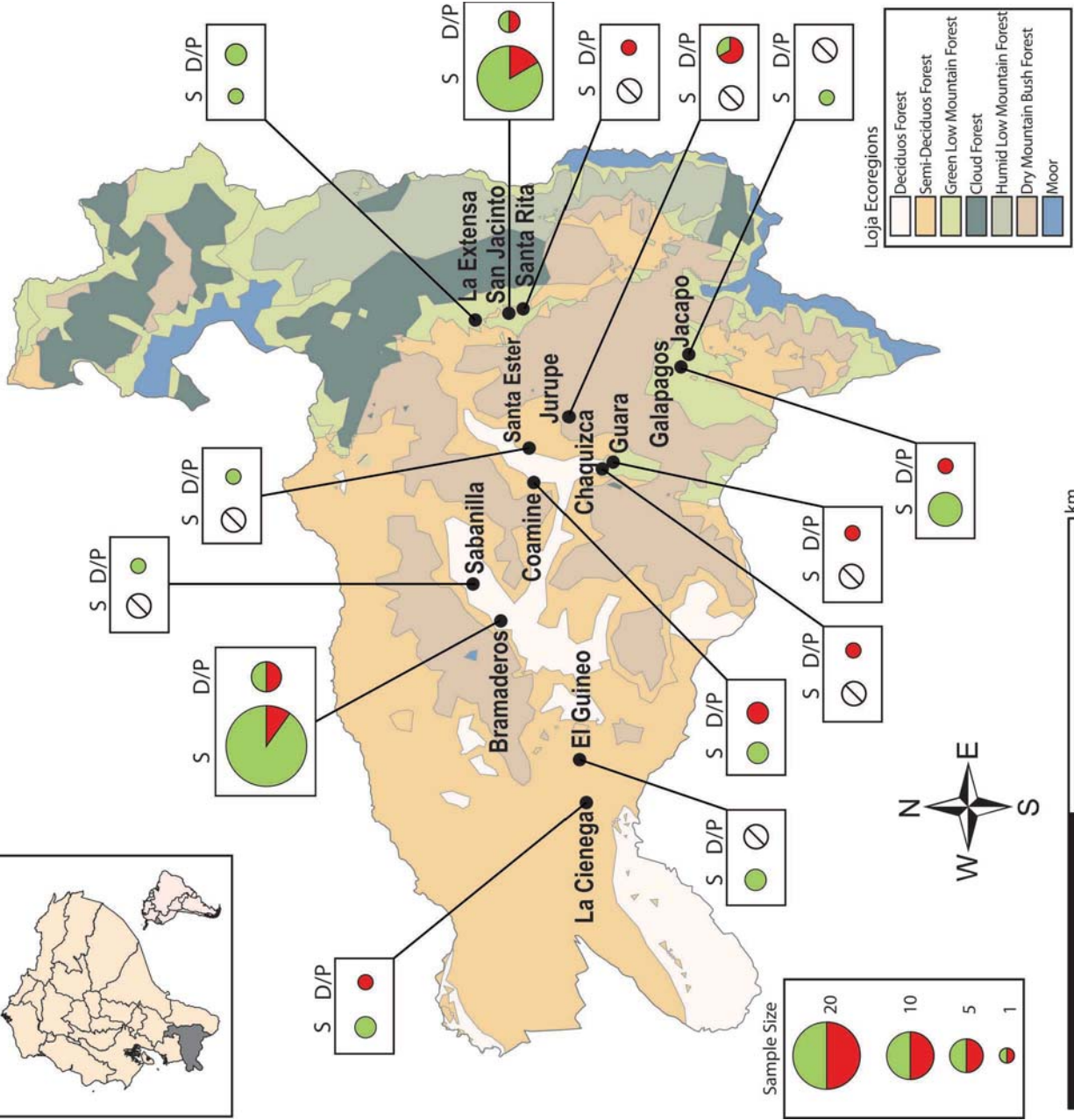
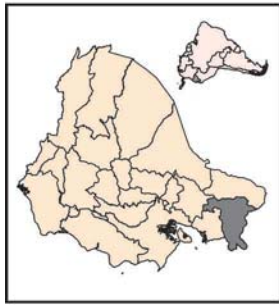
**Proportion of loci showing a significant excess in heterozygosity after a sequential Bonferroni correction. Calculated in ARLEQUIN v3.1 (29)

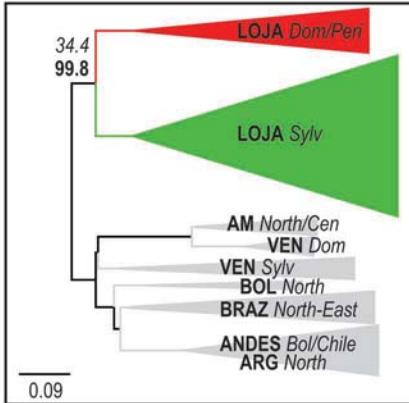
†Proportion of loci showing significant deficit in heterozygosity after a sequential Bonferroni correction. Calculated in ARLEQUIN v3.1(29)

††Mean FIS over loci ± standard error, calculated in FSTAT (28)

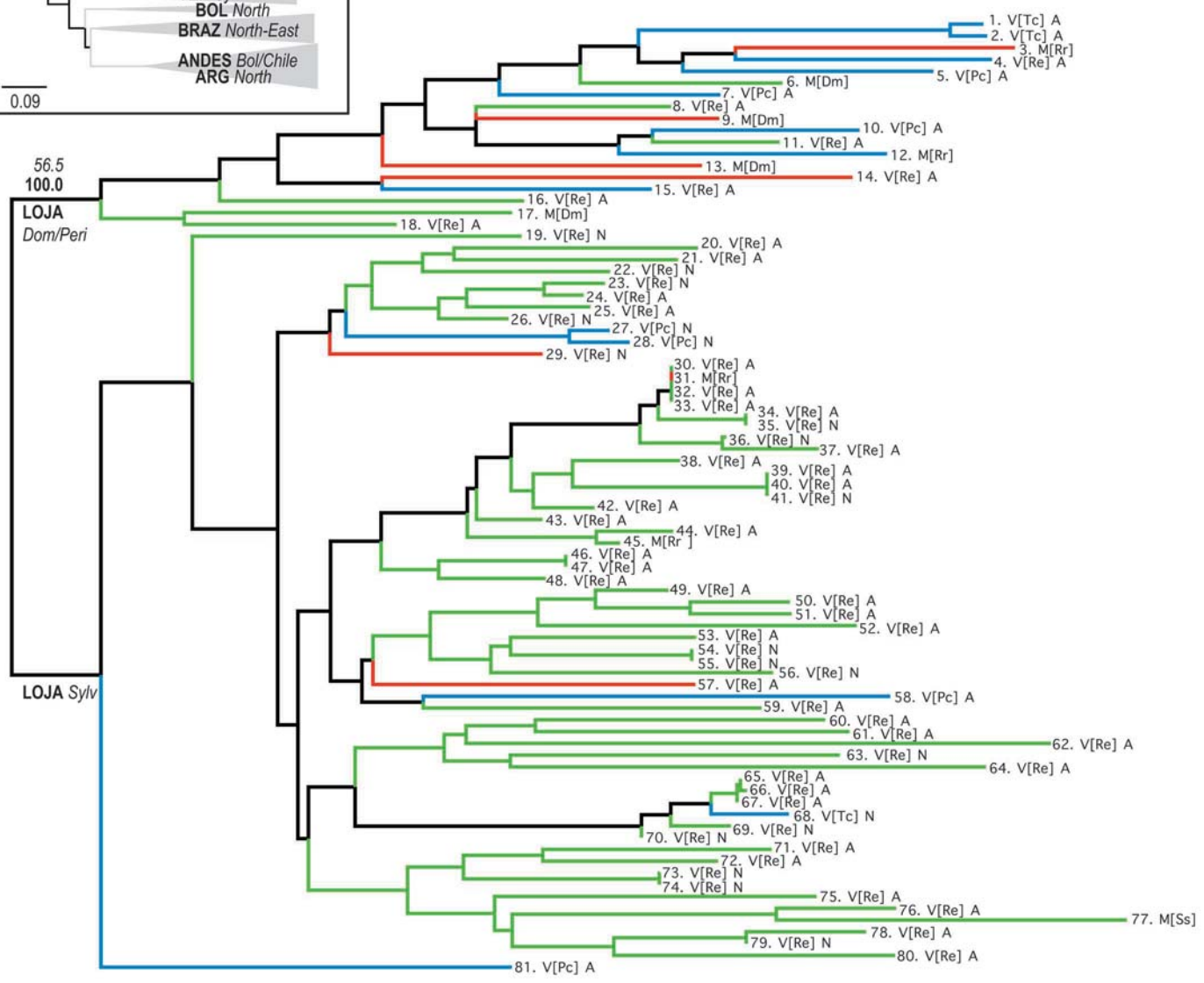
‡Calculated in Multilocus v1.3; p-value derived through comparison to a null distribution of 1,000 randomizations. Median values taken from 1,000 diploid resamplings of the multiallelic dataset.

‡‡Proportion of loci demonstrating significant pair-wise linkage (coefficient of correlation R_{GGB}, after a sequential Bonferroni correction. Calculated in LINKDOS(35)





■ Intradomiciliary origin
■ Peridomiciliary origin
■ Sylvatic origin



0.06

