

**Implementación de técnicas moleculares para diagnóstico y epidemiología de la
Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis en Colombia**

DIANA CAROLINA HERNÁNDEZ CASTRO

**Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
Facultad de Ciencias
Universidad el Bosque
2016**

**Implementación de técnicas moleculares para diagnóstico y epidemiología de la
Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis en Colombia**

**Tesis presentada como requisito para optar al título:
MAGISTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

DIANA CAROLINA HERNÁNDEZ CASTRO

**Director:
JUAN DAVID RAMÍREZ GONZÁLEZ, M.Sc., Ph.D
Profesor Principal
Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
Universidad del Rosario**

**Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
Facultad de Ciencias
Universidad el Bosque
2016**

"La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, sólo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia".

Agradecimientos

A Dios

A mi familia: Mamá, Papá, Aníbal y Mónica

A la Dra. Zulma Cucunubá

Al Dr. Juan David Ramírez

A los Drs. Mario Olivera, Carlos Valencia, Diana Agreda y Cielo León.

Al grupo de Parasitología investigación, las Dras. Sofía Duque y Adriana Arévalo.

Al grupo de Parasitología Red, las Dras. Carolina Flórez, Martha Ayala, Liliana Cortés, Ángela Guerra, Lesly Guasmayan, Lida Muñoz y Dr. Andrés Caicedo.

Al grupo de investigaciones microbiológicas de la Universidad del Rosario GIMUR

A las entomólogas Helena Brochero, Susane Ardila y Patricia Fuya.

A los epidemiólogos de MPS, Drs. Mauricio Vera y Pilar Zambrano.

A todo el personal de la Red Chagas Colombia.

A todos los profesores de la maestría en Ciencias Biomédicas de la Universidad el Bosque, Dras. Jaqueline Chaparro, Myriam Velandia, Nadia Castañeda y Dr. Jaime Castellanos

Los objetivos relacionados con enfermedad de Chagas fueron financiados por el Departamento Administrativo Nacional de Ciencia y Tecnología de Colombia “Francisco José de Caldas – COLCIENCIAS”, la “Unión Temporal Programa Nacional de Investigación para la prevención, control y tratamiento integral de la enfermedad de Chagas en Colombia”, Contrato No. 380- 2011, código 5014-537-30398.

Los objetivos relacionados con Leishmaniasis fueron financiados por el Proyecto de Fortalecimiento de la capacidad diagnóstica, de investigación y de vigilancia de enfermedades transmisibles emergentes y reemergentes. Componente ETV. Financiado por Colciencias.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado en primera instancia a Dios y mi familia que están conmigo en todo momento, apoyándome y dándome las fuerzas necesarias para cumplir con todas las metas que me propongo en todos los sentidos de la vida y que me apoyaron en todo el proceso de formación de la maestría. Gracias en especial a mis padres porque todo lo que pueda hacer en mi vida se lo debo principalmente a ustedes, gracias por mi formación, por mi educación y por hacerme una persona soñadora siempre dispuesta a cumplir sus propósitos y por enseñarme siempre a ser persistente y disciplinada en todo lo que me proponga en la vida. Gracias a mi pareja Aníbal, por ayudarme con tus conocimientos, por comprenderme y por estar acompañándome siempre, por las largas traspasadas, por tu compañía y por el mejor tinto en las madrugadas.

En segunda instancia, a dos personas que permitieron mi formación en la maestría, Juan David y Zulma, adicionalmente por ser el mejor ejemplo académico que una persona en formación ha podido tener.

A Juan David, gracias por apoyarme en todo, por ayudarme en todo, gracias por transmitirme tanto conocimiento, por confiar ciegamente en mi trabajo, por entender cualquier situación o problema que se pudo presentar en cualquier momento, gracias por estar siempre dispuesto para atender cualquier inquietud, eventualidad o situación, gracias por buscar siempre fortalecer mi conocimiento con cursos y congresos, por apoyarme en todas las ideas que quise desarrollar, por corregirme cuando lo necesite, gracias por ser un ejemplo como profesional y como persona, gracias por tu ejemplo de sencillez a pesar de tantos éxitos que has obtenido, gracias por tener en cuenta mi opinión, gracias por siempre querer lo mejor para mí, gracias por vincularme a tu equipo de trabajo, gracias infinitas por estar ahí para el trabajo pero también como amigo en todos los momentos importantes desde que nos conocimos, gracias por transmitirme tus experiencias para que yo pueda mejorar, gracias por ser el mejor tutor que alguien podría tener, por tus consejos y por buscar siempre mi bienestar profesional y personal. ¡Gracias por hacer realidad este trabajo, porque sin tu gran apoyo no hubiera podido realizarlo!! No me alcanzan las palabras para expresarte el gran agradecimiento que siento hacía ti por todo lo que has hecho y lo que harás e mi formación académica.

A Zulma, gracias por haberme dado la oportunidad de iniciar mi proceso como investigadora, primero como joven investigador en el INS, gracias por enseñarme a escribir correos, gracias porque siempre confiaste en mí, gracias por encontrar personas que fortalecieron mi formación en biología molecular, gracias por permitirme aprender en todo el proceso de formulación, aprobación y consolidación de la Red Chagas Colombia, fue una excelente oportunidad para mí, en la que pude recibir el mejor ejemplo de tu parte, como persona y como profesional. Gracias por estar siempre ahí para ayudarme en todo lo que necesité todo el tiempo, gracias impulsarme siempre a salir adelante, por impulsarme siempre a mejorar mi formación, gracias por hacer parte de mis metas siempre contribuyendo a mi formación sin esperar nada a cambio, gracias por apoyarme en todos los cursos que pude realizar, gracias por corregirme siempre que tuve errores. Gracias por ser un gran ejemplo, por mostrarme esa

mujer que lucha por sus sueños, que persiste para llegar lejos y que es una mujer brillante, excepcional y única, que merece llegar muy lejos. ¡Gracias por este trabajo, porque sencillamente sin tú gran ayuda este trabajo no se hubiera podido realizar!! Sencillamente, ¡las palabras no me alcanzan para agradecerte por todo lo que hiciste por mí en este tiempo!!!

A mis grandes amigos y compañeros de trabajo Mario y Carlos, por su gran ayuda desde que inicié este trabajo, por su paciencia y por su apoyo incondicional en todo, por acompañarme en los momentos buenos, pero sobre todo por estar siempre conmigo en los momentos difíciles.

A mis mejores amigas Katerin, Luisa, Brenda e Ingrid, gracias por su paciencia, por entender mi falta de tiempo para ustedes y por apoyarme, aconsejarme en todo momento y por estar incondicionalmente en los momentos difíciles.

Resumen

Introducción: La enfermedad de Chagas y las leishmaniasis son enfermedades de gran importancia epidemiológica en Colombia. Las técnicas moleculares proporcionan herramientas que facilitan el estudio de estas enfermedades. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue la implementación de técnicas moleculares que permitan mejorar el diagnóstico y realizar estudios de epidemiología molecular en el país.

Metodología: Se recolectaron 708 muestras de pacientes con enfermedad de Chagas, 245 triatomínicos y 39 reservorios. Se aplicaron las siguientes técnicas moleculares: PCR convencional y tiempo real para diagnóstico, cuantificación y genotipificación de *T. cruzi* en muestras de pacientes, triatóminos y reservorios. PCR-HRM para determinación de fuentes alimenticias de triatóminos. Análisis de microsatélites en muestras de pacientes, triatomínicos y reservorios involucrados en brotes de transmisión oral. Lo anterior, con el fin de determinar las capacidades operativas de las técnicas moleculares, cargas parasitarias y DTUs en pacientes con enfermedad de Chagas. Adicionalmente, conocer los índices de infección triatomínica, DTUs y preferencias alimenticias de triatomínicos en el país y realizar análisis de epidemiología molecular en dos brotes de transmisión oral en Colombia. En cuanto a Leishmaniasis, se incluyeron en el estudio aislamientos obtenidos de pacientes con Leishmaniasis cutánea, flebótomos y reservorios. Se realizó el diseño de un PCR-HRM para la identificación de las seis especies de *Leishmania spp* descritas previamente en el país. Se implementó la amplificación y secuenciación del gen *citocromo b* para identificación de especies de *Leishmania spp*.

Resultados: En enfermedad de Chagas, el desempeño diagnóstico de las pruebas moleculares fue mejor en fase aguda que en fase crónica de la enfermedad. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cargas parasitarias según la fase clínica. Se reafirma la amplia distribución de la DTU TcI en pacientes, triatomínicos y reservorios. Se encontraron altos porcentajes de infección por *T. cruzi* y alimentación con sangre humana en especies de triatomínicos consideradas secundarias en el país. Se encontró que el posible origen de uno de los brotes de transmisión oral fue la contaminación de alimentos con heces de triatóminos, mientras que en el segundo brote el posible origen corresponde a la contaminación de alimentos con secreciones odoríferas de zarigüeyas. En las leishmaniasis, la PCR-HRM de *HSP-70* permite la identificación de *L. amazonensis* en el subgénero *L. Leishmania* y de *L. panamensis* en el subgénero *L. Viannia*; mientras ITS-1 permite la discriminación entre *L. amazonensis* y *L. infantum* y entre *L. braziliensis* y *L. guyanensis*. Mediante secuenciación del gen *citocromo b* se logró la detección de dos especies de *Leishmania spp*. que no habían sido previamente reportadas en el país *L. equatoriensis* y *L. lainsoni* y se realizaron mapas de distribución de todas las especies detectadas, así como su distribución en todo el circuito epidemiológico.

Conclusión: Se logró la implementación exitosa de diferentes técnicas moleculares que fueron de utilidad para diagnóstico y epidemiología molecular de la enfermedad de Chagas y de las leishmaniasis, proporcionando nuevo conocimiento y dejando disponibles dichas técnicas para su uso en el país mediante el Instituto Nacional de Salud.

Abstract

Introduction: Chagas disease and leishmaniasis are diseases of great epidemiological importance in Colombia. Molecular techniques provide tools that facilitate the study of these diseases. For this reason, the objective of this study was the implementation of molecular techniques to improve diagnosis and molecular epidemiology studies in the country.

Methods: 708 samples of patients with Chagas' disease, 245 triatomines and 39 reservoirs were collected. The following molecular techniques were applied: conventional and real-time PCR for diagnosis, quantification and genotyping of *T. cruzi* in samples from patients, triatomines and reservoirs. PCR-HRM for determination of food sources of triatomines. Microsatellite analysis in samples from patients, triatomines and reservoirs involved in outbreaks of oral transmission. The above, in order to determine the operative capacities of molecular techniques, parasitic loads and DTUs in patients with Chagas' disease. Additionally, to know the triatomic infection rates, DTUs and food preferences of triatomines in the country and to perform analysis of molecular epidemiology in two outbreaks of oral transmission in Colombia. As for Leishmaniasis, isolates obtained from patients with cutaneous leishmaniasis, sandflies and reservoirs were included in the study. A PCR-HRM was designed to identify the six species of *Leishmania spp* previously described in the country. Amplification and sequencing of the *cytochrome b* gene for the identification of *Leishmania spp*.

Results: In Chagas' disease, the diagnostic performance of the molecular tests was better in the acute phase than in the chronic phase of the disease. Statistically significant differences were observed between parasite loads according to the clinical phase. The wide distribution of DTU TcI in patients, triatomines and reservoirs is reaffirmed. High percentages of *T. cruzi* infection and human blood feeding were found in triatomine species considered secondary in the country. It was found that the possible origin of one of the outbreaks of oral transmission was food contamination with feces of triatomines, whereas in the second outbreak the possible origin corresponds to the contamination of foods with odoriferous secretions of opossums. In the leishmaniasis, HSP-70 PCR-HRM allows the identification of *L. amazonensis* in the subgenus *L. Leishmania* and of *L. panamensis* in the subgenus *L. Viannia*; While ITS-1 allows discrimination between *L. amazonensis* and *L. infantum* and between *L. braziliensis* and *L. guyanensis*. By means of sequencing of the cytochrome b gene the detection of two species of *Leishmania spp*. Which had not previously been reported in the country *L. equatoriensis* and *L. lainsoni*, and distribution maps of all the species detected, as well as their distribution throughout the epidemiological circuit.

Conclusion: Successful implementation of different molecular techniques that were useful for diagnosis and molecular epidemiology of Chagas' disease and leishmaniasis was achieved, providing new knowledge and making available these techniques for use in the country through the National Institute of Health .

Tabla de Contenido

1	INTRODUCCIÓN	12
2	MARCO TEÓRICO	19
2.1	ENFERMEDAD DE CHAGAS	19
2.1.1	Agente etiológico	19
2.1.2	Mecanismos de transmisión	22
2.1.3	Epidemiología	24
2.1.4	Ciclos de transmisión	25
2.1.5	Fases de la Enfermedad	26
2.1.6	Diagnóstico	27
2.1.7	Tratamiento	33
2.2	LAS LEISHMANIASIS	34
2.2.1	Agente etiológico	34
2.2.2	Mecanismos de transmisión	38
2.2.3	Epidemiología	40
2.2.4	Formas clínicas de la enfermedad	41
2.2.5	Diagnóstico	42
2.2.6	Métodos moleculares para tipificación de especies de <i>Leishmania</i> spp.	44
2.2.7	Tratamiento	46
2.2.8	Ciclo de transmisión	46
3	JUSTIFICACIÓN	49
4	OBJETIVOS	52
4.1	OBJETIVO GENERAL	52
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
5	METODOLOGIA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
5.1	DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE <i>T. cruzi</i>	53
5.1.1	Diagnóstico y epidemiología molecular de <i>T. cruzi</i> en fases clínicas de enfermedad de Chagas	53
5.1.2	Diagnóstico y epidemiología molecular de <i>T. cruzi</i> para seguimiento del tratamiento etiológico en pacientes crónicos con Enfermedad de Chagas	75
5.1.3	Diagnóstico y epidemiología molecular de <i>T. cruzi</i> en triatomíneos	81
5.1.4	Diagnóstico y epidemiología molecular de <i>T. cruzi</i> para análisis de dinámica de transmisión en brotes de posible transmisión oral	101
5.2	DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE <i>Leishmania</i> spp.	101
5.2.1	Estandarización de ensayo High resolution Melting para identificación de especies de <i>Leishmania</i> spp.	116
5.2.2	Identificación de especies de <i>Leishmania</i> spp. mediante secuenciación del gen <i>citocromo b</i>	129
6	CONCLUSIONES	137
7	ANEXOS	139
7.1	Protocolos	139
7.2	Publicaciones	139
8	BIBLIOGRAFIA	143

Tabla de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 2. Distribución de enfermedad de Chagas y enfermedad del sueño en el mundo. ...	25
Figura 3. Representación esquemática de micicírculos de <i>T. cruzi</i>	30
Figura 4. Clasificación taxonomica del género <i>Leishmania spp.</i>	35
Figura 5. Ciclo de vida y formas celulares de <i>Leishmania spp.</i>	36
Figura 6. Distribución de casos de leishmaniasis visceral y leishmaniasis cutánea en Colombia en el año 2008.....	41
Figura 7. Algoritmo de genotipificación de <i>T. cruzi</i>	59
Figura 8. Algoritmo de selección de pacientes	60
Figura 9. Distribución de cargas parasitarias en pacientes con enfermedad de Chagas en diferentes fases clínicas.....	63
Figura 10. Curvas ROC de pruebas moleculares en fase aguda y crónica de enfermedad de Chagas	64
Figura 11. Curvas ROC de pruebas moleculares en fases crónica indeterminada y crónica cardiaca de enfermedad de Chagas	65
Figura 12. Cargas parasitarias según las DTUs	69
Figura 13. Cargas parasitarias de genotipos TcI según fase clínica.....	70
Figura 14. Cargas parasitarias pre y post tratamiento etiológico.....	77
Figura 15. Absorbancias de ELISA	78
Figura 16. Distribución de especies de Triatomino recolectados en Colombia.	83
Figura 17. Número de ejemplares por especie de triatomino recolectados.....	84
Figura 18. Frecuencia de ecótopos según especies de triatomino	85
Figura 19. Frecuencias de triatomino positivos para <i>T. cruzi</i> y posición de cada una de las especies.	86
Figura 20. Preferencias alimenticias encontradas en triatomino analizados.	88
Figura 21. Frecuencia de preferencias alimenticias en cada una de las especies de Triatomino analizadas.....	88
Figura 22. Preferencias alimenticias encontradas en los diferentes ecótopos de recolección de insectos triatomino.....	89
Figura 23. Preferencias alimenticias según especies encontradas y ecótopos	89
Figura 24. Fuentes alimenticias encontradas en insectos triatomino infectados con <i>T. cruzi</i>	90
Figura 25. Frecuencia de especies de triatomino analizados infectados con <i>T. cruzi</i> y alimentados con sangre humana	91
Figura 26. Distribución de DTUs de <i>T. cruzi</i> según especies recolectadas y ecótopos.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 27. Distribución de genotipos de <i>T. cruzi</i> según especies recolectadas y ecótopos	95
Figura 28. Localización geográfica de municipios en los que se presentaron brotes, Paz de Ariporo, Casanare y Cumaral, Meta.	102
Figura 29. Imágenes de la finca índice en brote de Cumaral, Meta.....	104
Figura 30. Imágenes de hotel y restaurante ubicado en pozo petrolero de caño chiquito en Paz de Ariporo.....	106

Figura 31. Cargas parasitarias en brotes de posible transmisión oral. Se muestran las cargas parasitarias en cada uno de los brotes.	107
Figura 32. Árbol de distancias genéticas de microsátélites de <i>T. cruzi</i> obtenido en circuitos epidemiológicos de brotes de posible transmisión oral.....	110
Figura 33. Alineamiento múltiple de secuencias de <i>HSP-70</i> de 6 especies de <i>Leishmania spp.</i>	118
Figura 34. Secuencia consenso de alineamiento múltiple y diseño de iniciadores	119
Figura 35. Alineamiento de amplicón de <i>HSP-70</i> de 6 especies de <i>Leishmania spp.</i>	120
Figura 36. Curvas de fusión normalizadas y diagrama de cajas y bigotes de temperaturas de fusión del gen <i>HSP-70</i> en 6 especies <i>Leishmania spp.</i> A	122
Figura 37. Curvas de fusión normalizadas y diagrama de cajas y bigotes de temperaturas de fusión del gen ITS-1 en 6 especies <i>Leishmania spp.</i>	123
Figura 38. Curvas de fusión derivadas obtenidas de PCR-HRM de <i>HSP-70</i> e ITS-1.	124
Figura 39. Algoritmo para detección de 6 especies de <i>Leishmania</i> mediante PCR-HRM de <i>HSP-70</i> e ITS-1.	125
Figura 40. Frecuencia de especies de <i>Leishmania spp</i> detectadas mediante secuenciación de citocromo b.....	131
Figura 41. Actualización de distribución de especies de <i>Leishmania spp.</i> en Colombia..	132
Figura 42. Distribución de 9 especies de <i>Leishmania spp.</i> por departamento en Colombia	133
Figura 43. Frecuencia de especies de <i>Leishmania spp.</i> en circuito epidemiológico.....	134

Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencias de sondas e iniciadores usados para detección y cuantificación de ADN de <i>T. cruzi</i> mediante qPCR, PCRst y PCRk.....	57
Tabla 2. Características generales de los pacientes incluidos en el estudio.....	61
Tabla 3. Medianas de parasitemias de pacientes con enfermedad de Chagas según las fases clínicas.....	61
Tabla 4. Capacidades operativas de pruebas moleculares en fase aguda y crónica de enfermedad de Chagas	63
Tabla 5. Capacidades operativas de pruebas moleculares en fase crónica de enfermedad de Chagas.....	63
Tabla 6. Medianas de cargas parasitarias de pacientes con enfermedad de Chagas según grupos de edad.....	65
Tabla 7. Capacidades operativas de las técnicas moleculares en los diferentes grupos de edad	66
Tabla 8. Frecuencias de DTUs y genotipos TcI en pacientes en fase aguda y crónica enfermedad de Chagas	67
Tabla 9. Frecuencias de DTUs y genotipos TcI en pacientes en fase crónica indeterminada y crónica cardíaca de enfermedad de Chagas	68
Tabla 10. Capacidades operativas con la DTUs TcI y TcII	70
Tabla 11. Capacidades operativas con los genotipos TcI-Selvático y TcI-Doméstico.....	71
Tabla 12. Características generales de pacientes quienes recibieron tratamiento etiológico.....	76
Tabla 13. Resultados positivos mediante serología y qPCR pre y post tratamiento etiológico	76
Tabla 14. Comparación de cargas parasitarias y absorbancias de ELISA pre y post tratamiento.....	78
Tabla 15. Frecuencias de DTUs y genotipos TcI detectados pre y pos tratamiento etiológico	78
Tabla 16. Especies de mamíferos detectados mediante HRM de <i>citocromo b</i> en triatomíneos	81
Tabla 17. Positividad de <i>T. cruzi</i> de acuerdo a la localización geográfica.	86
Tabla 18. Positividad de <i>T. cruzi</i> de acuerdo al ecótopo de recolección.	87
Tabla 19. Estadio de insectos positivos para <i>T. cruzi</i>	87
Tabla 20. Frecuencias de positividad para <i>T. cruzi</i> y alimentación con sangre en cada una de las especies más representativas.....	91
Tabla 21. Variables relacionadas con positividad para <i>T. cruzi</i> en insectos triatomíneos.....	91
Tabla 22. DTUs de <i>T. cruzi</i> encontradas en insectos triatomíneos analizados	93
Tabla 23. Muestras recolectadas en cada uno de los brotes de posible transmisión oral... ..	106
Tabla 24. Resultados obtenidos en muestras recolectadas en los brotes mediante técnicas de diagnóstico serológicas, parasitológicas y moleculares.	106
Tabla 25. Frecuencias de DTUs detectadas en circuito epidemiológico de Brote de Cumaral.	108
Tabla 26. Frecuencias de DTUs detectadas en circuito epidemiológico de Brote de Paz de Aripuro.	108
Tabla 27. Alelos detectados en los 7 loci analizados	109

Tabla 28. Aislamientos de especies de <i>Leishmania spp.</i> reportadas en Colombia	116
Tabla 29. Resultados de identificación de especies de <i>Leishmania spp.</i> en aislamientos obtenidos de pacientes, insectos y reservorios.....	126

1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores constituyen un grave problema de salud pública. Entre estas infecciones, se encuentran las causadas por parásitos protozoarios como Malaria (*Plasmodium spp.*), Enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), Leishmaniasis (*Leishmania spp.*) y Tripanosomiasis africana (*Trypanosoma brucei*).

Para el caso de la enfermedad de Chagas, se calcula que existen entre 8 y 10 millones de personas infectadas en el mundo, con un número de muertes al año de 12.000 aproximadamente (1). La leishmaniasis representa un problema de salud pública en 98 países, en los cuales se estima que cada año se producen 1.3 millones de nuevos casos y entre 20.000 y 40.000 defunciones (2).

En Colombia, para la enfermedad de Chagas, se calcula que existen 436.000 personas infectadas y se han presentado 10 brotes de posible transmisión oral, cuya letalidad ha sido del 16% (1,3). En el caso de las leishmaniasis, Colombia ocupa el segundo lugar en incidencia en América después de Brasil, pasando de 6.000 a 20.000, el número de casos anuales entre el 2003 y 2006 (2).

Uno de los principales objetivos de la investigación básica es el desarrollo de métodos precisos para el diagnóstico y análisis de *T. cruzi* y *Leishmania spp.*, aún más teniendo en cuenta que son parásitos que co-habitan en ciclos epidemiológicos similares. Sumado esto al constante desarrollo de técnicas basadas en el ADN, varios investigadores han desarrollado y evaluado métodos moleculares como la PCR (Reacción en cadena de polimerasa) convencional (4–7), qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real) (8–12), LAMP (amplificación isotérmica de ácidos nucleicos mediada por lazo) (13–18), PCR-RFLP (PCR-polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) (19–21), PCR-HRM (PCR-análisis de alta resolución de temperatura de fusión) (22,23), encontrando que son técnicas de gran utilidad para el diagnóstico ya que muestran elevada sensibilidad y especificidad; pueden ser utilizadas en algunos de los escenarios clínicos y a su vez en muestras obtenidas de humanos, reservorios y vectores, proporcionando información útil para el adecuado manejo clínico, terapéutico y para el análisis ecológico, ambiental y geográfico de estas parasitosis.

Adicionalmente, se han desarrollado herramientas de alto poder de resolución para el análisis de la diversidad genética de estos agentes etiológicos tales como la secuenciación de genes, análisis MLST (por sus siglas en inglés multilocus sequence typing) (24–27) y análisis MLMT (por sus siglas en inglés multilocus microsatellite typing) (28–30) que proporcionan información acerca de la variabilidad genética de los parásitos, información que es muy valiosa para la caracterización del comportamiento de estas parasitosis.

En la Enfermedad de Chagas, el diagnóstico es complejo debido a la dinámica de la parasitemia durante las fases de la enfermedad. Los métodos directos permiten la detección del parásito durante la fase aguda, pero presentan muy baja sensibilidad durante la fase crónica (31). Las técnicas serológicas son de elección para el diagnóstico de la enfermedad

de Chagas durante la fase crónica, sin embargo presentan algunas dificultades como su baja sensibilidad durante la fase aguda, ya que pueden ser negativas durante los primeros días de la infección (32,33).

Así mismo, en las pruebas serológicas se ha reportado baja especificidad dado que se han observado reacciones cruzadas con *Trypanosoma rangeli* y *Leishmania spp.* y baja concordancia entre pruebas usando antígenos crudos y recombinantes (34–36). Por lo tanto, se han utilizado ampliamente técnicas como la PCR convencional y la qPCR con el fin de detectar y cuantificar el ADN de *T. cruzi* (7–9,12). En Colombia, aún no se ha realizado un estudio que permita evaluar la utilidad de la PCR y qPCR para la detección y cuantificación de ADN de *T. cruzi*, en muestras obtenidas de todas las fases clínicas, triatomíneos y reservorios mamíferos.

En las leishmaniasis, el diagnóstico de la enfermedad también presenta complejidad, esto debido a que las leishmaniasis tienen un amplio espectro de manifestaciones clínicas y pueden ser confundidas con otras patologías coexistentes (37). Adicionalmente, tanto las manifestaciones clínicas como la respuesta terapéutica se relacionan con la especie involucrada en la infección (10,11).

El estándar de oro para el diagnóstico de las leishmaniasis es la observación directa en frotis y/o aislamiento en cultivo del parásito. Las pruebas directas presentan una elevada especificidad (100.0%), sin embargo, su sensibilidad es baja y altamente variable dado que se ve afectada por diferentes aspectos, entre ellos el tiempo de las lesiones cutáneas, el órgano del que se obtenga el aspirado y la experiencia del operador en la toma de muestra y en la identificación del parásito. Las pruebas serológicas son de gran utilidad en el diagnóstico de la leishmaniasis visceral, las pruebas rápidas y ELISA, usando antígenos recombinantes como rK39 (secuencia repetitiva de 39 aminoácidos, del carbono terminal de una proteína de la familia de las kinesinas de *Leishmania chagasi*) han mostrado una sensibilidad entre 98-100% y especificidad del 98.0% (38). Sin embargo, la principal limitación de estos métodos es la identificación de especies y por esto el estándar de oro para identificación de especies es la técnica de MLEE (por sus siglas en inglés multilocus enzyme electrophoresis), que es una técnica muy dispendiosa, los patrones electroforéticos son de difícil interpretación, los resultados no son fácilmente reproducibles entre diferentes laboratorios y tarda mucho tiempo en proporcionar resultados ya que requiere crecimiento masivo del parásito (10,11,39,40). Por lo anterior, se han implementado técnicas moleculares como la PCR (convencional, qPCR, LAMP, HRM y PCR-RFLP) y secuenciación, para la detección de ADN del género *Leishmania spp.* e identificación de especies directamente en diferentes muestras biológicas, facilitando ampliamente el acceso al diagnóstico rápido, proporcionando mayor sensibilidad (100%) y permitiendo analizar aspectos como el pronóstico de la enfermedad y el comportamiento terapéutico a diferentes tratamientos (11,13,18).

Finalmente, a pesar de los avances realizados en el país en enfermedad de Chagas y Leishmaniasis, existen vacíos respecto al uso de técnicas moleculares que puedan dar soporte

al diagnóstico y análisis de epidemiología molecular. Por lo tanto, esta investigación pretende aportar conocimiento mediante la implementación de técnicas moleculares de diagnóstico y tipificación de los agentes etiológicos de estas enfermedades, para de esta forma contribuir al fortalecimiento de la capacidad diagnóstica y del conocimiento de las características genéticas del parásito que puedan estar relacionadas con las manifestaciones clínicas y epidemiológicas de estas parasitosis.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS

2.1.1 Agente etiológico

El agente etiológico de la enfermedad es el parásito protozooario y hemoflagelado, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Su clasificación taxonómica es la siguiente:

- **Reino:** *Protista*
- **Phylum:** *Sarcomastigophora*
- **Sub-phylum:** *Mastigophora*
- **Clase:** *Zoomastigophorea*
- **Orden:** *Kinetoplastida*
- **Sub-orden:** *Trypanosomatina*
- **Familia:** *Trypanosomatidae*
- **Género:** *Trypanosoma*
- **Especie:** *cruzi*

Debido a que el parásito pertenece al orden *Kinetoplastida*, se caracteriza por la presencia de flagelo y una estructura prominente y paraflagelar conocida como quinoplasto que corresponde a una condensación de ADN mitocondrial localizado en el interior de una única mitocondria que está ramificada por toda la célula (41).

2.1.1.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida transcurre en dos hospederos, el hospedero invertebrado (insectos de la familia *Reduviidae*) y el hospedero vertebrado (reservorios mamíferos y humanos) (Figura 1).

El ciclo biológico de *T. cruzi* inicia cuando el insecto triatomino ingiere sangre de un hospedero vertebrado, adquiriendo el parásito en su forma tripomastigote circulante. Estas formas van a la parte anterior y posterior del sistema digestivo del triatomino, una vez allí se diferencian en formas epimastigotas y esferomastigotas. Posteriormente, los parásitos migran hacia el intestino donde los epimastigotes se replican mediante fisión binaria y se adhieren a la mucosa del intestino del insecto triatomino mediante el flagelo, luego pasan al recto, y en la región posterior se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, estos últimos se adhieren al epitelio de la ampolla rectal del insecto triatomino y así pueden ser eliminados en las heces (42).

En el hospedero vertebrado, el ciclo comienza cuando los tripomastigotes metacíclicos ingresan en el sitio de la picadura del vector o mucosas del vertebrado. Los tripomastigotes

metacíclicos, son formas que presentan gran movilidad y pueden invadir las mucosas e infectar una amplia variedad de células (macrófagos, células musculares lisas y estriadas, células de Schwann, fibroblastos, células de la glía y neuronas). La infección a las células se realiza mediante fagocitosis, proceso en el cual se forma una vacuola parasitófora que se fusiona con lisosomas celulares, lo que estimula que los tripomastigotes se transformen en amastigotes. Los amastigotes se replican por fisión binaria y lisan la membrana de la vacuola. Los amastigotes se transforman a tripomastigotes y estos generan lisis celular, liberándose al torrente sanguíneo e infectando nuevas células (42).

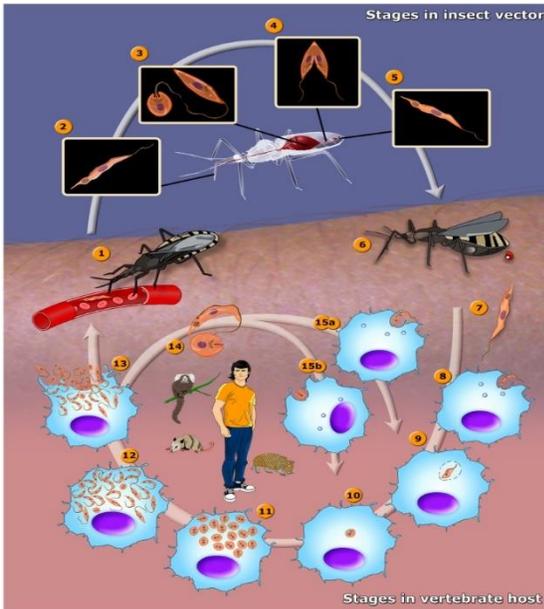


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. 1. El insecto vector (femenino o masculino) pica a un hospedero mamífero infectado con el parásito e ingiere sangre con tripomastigotes 2. Forma celular: tripomastigotes 3. Los tripomastigotes se transforman en epimastigotes y algunos en esferomastigotes 4. Los epimastigotes se multiplican en el intestino medio 5. Los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos en el intestino del vector 6. El insecto vector pica nuevamente a un hospedero mamífero y luego de alimentarse de su sangre defeca cerca al sitio de la picadura eyectando las formas tripomastigotes metacíclicos 7. Forma celular: tripomastigotes metacíclicos 8. Los tripomastigotes metacíclicos infectan los macrófagos 9. Los tripomastigotes metacíclicos adquieren la forma de amastigotes dentro la vacuola parasitófora 10. Los amastigotes se liberan de la vacuola 11. Los amastigotes se multiplican en el citoplasma 12. Los amastigotes adquieren la forma de tripomastigotes 13. Los tripomastigotes lisan la célula y se liberan al torrente sanguíneo 14. Formas celulares: amastigotes y tripomastigotes 15. (a) Los tripomastigotes infectan nuevas células (b) Los amastigotes infectan nuevas células. Tomado de Texeira et al.,2012 (42).

Los estadios de vida del parásito presentan diversidad en su morfología, ubicación del quinetoplasto, movilidad y capacidad reproductiva. De esta manera se clasifican las siguientes formas celulares del parásito:

- **Amastigote:** Presenta forma ovalada, es la forma replicativa a nivel intracelular, está presente en los hospederos vertebrados y carecen de movilidad, el quinoplasto se encuentra posterior al núcleo.
- **Epimastigote:** Su forma es alargada, presenta el flagelo y una corta membrana ondulante por lo que su movilidad es limitada, el quinoplasto se encuentra posterior al núcleo. Esta forma es replicativa mediante fisión binaria en la porción anterior del sistema digestivo del vector. Adicionalmente, es la forma que se desarrolla en cultivos axénicos.
- **Tripomastigote:** Es una forma elongada que carece de actividad replicativa, presenta flagelo y una membrana ondulante prominente por lo que presenta gran movilidad. El quinoplasto se encuentra en la parte anterior del núcleo. La forma metacíclica se encuentra en la ampolla rectal del vector y la forma circulante en el hospedero vertebrado.

2.1.1.2 Diversidad genética

T. cruzi muestra una alta variabilidad genética, por lo que utilizando diferentes marcadores moleculares y características biológicas, ha sido clasificado mediante consenso internacional en seis unidades discretas de tipificación (por sus siglas en inglés Discrete Typing Units) cuya nomenclatura está dada como TcI a TcVI y adicionalmente se ha descrito un genotipo adicional emergente conocido como TcBat (43). Una DTU se define como un grupo de cepas cuyas características genéticas son idénticas, es decir que al ser evaluadas por un conjunto de marcadores moleculares o inmunológicos presentan el mismo comportamiento (43,44).

Las DTUs presentan asociación con diferentes características como la distribución geográfica, ciclos epidemiológicos de transmisión, vectores y manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, estas relaciones no son definitivas ya que con el aumento reciente de estudios que involucran la genotipificación de estas DTUs se ha evidenciado la presencia de un gran número de asociaciones (43,45–49).

Dentro de las seis DTUs, una de las más estudiadas ha sido la TcI, encontrándose ampliamente en el continente americano, se encuentra distribuida en los dos ciclos epidemiológicos doméstico y selvático y es la DTU con mayor frecuencia en Colombia, Venezuela y Centro América (43,47). En el ciclo silvestre se encuentra asociada con reservorios arbóreos como *Didelphis marsupialis* y con vectores de la Tribu *Rhodniini*. En los países del cono sur su distribución es mucho menor y está asociada con infección en roedores y especies del género *Triatoma* (49).

Se ha encontrado que dentro de la DTU TcI se presenta alta diversidad genética, inicialmente esta DTU fue clasificada en cinco genotipos (TcIa - TcIe), mediante el uso de la secuencia del gen SL-IR (por sus siglas en inglés spliced-leader intergenic region). Sin embargo, técnicas moleculares de mayor resolución como el MLMT y MLST han permitido identificar un clado emergente denominado TcI Doméstico que se ha distribuido desde América Central

hasta América del Sur debido a la migración humana y se encuentra asociado con el ciclo doméstico de transmisión e infección humana (25,50–52).

Las DTUs TcII, TcV y TcVI, se han descrito en ciclos domésticos en países del Cono Sur, sin embargo en Colombia se han descrito asociadas con ciclos domésticos y selváticos (43,47,53). En cuanto a la distribución en los reservorios, TcII ha sido encontrado en primates en Brasil y TcV y TcVI se han asociado con caninos en Argentina y Colombia (43,49,54).

TcIII y TcIV se asocian principalmente con ciclos silvestres y en pocos casos se han descrito en ciclos domésticos. En Colombia, las dos DTUs se han encontrado en co-infección con TcI en pacientes en fase crónica y TcIII en brotes de Chagas agudo (47,48). En Brasil, TcIV se ha asociado con brotes de transmisión oral y en Venezuela con algunos casos de transmisión vectorial (55,56). En el caso de TcIII se ha encontrado asociado con la especie de vectores *Panstrongylus geniculatus* y el reservorio *Dasypus novemcinctus*, así como otros mamíferos subterráneos. Para el caso de TcIV se ha encontrado asociado con primates, mapaches y caninos (43,49).

El genotipo TcBat se ha aislado de murciélagos en Brasil, Colombia y Panamá. En Colombia se ha descrito la infección por este genotipo en un caso humano, sin embargo no se asoció con la presencia de ningún síntoma o manifestación clínica (57). Adicionalmente, estudios recientes de MLST postulan que este genotipo puede ser considerado como una DTU independiente (58).

2.1.2 Mecanismos de transmisión

El principal mecanismo de transmisión de la enfermedad de Chagas es el vectorial. Sin embargo, existen otros tipos de transmisión con menor frecuencia, como la transmisión vertical, la transfusional, mediante trasplante de órganos, accidental en el laboratorio y la transmisión oral (59).

2.1.2.1 Transmisión vectorial

Los tripomastigotes metacíclicos del parásito presentes en las heces del vector, penetran por la herida que causa la picadura del insecto triatomino, por lesiones en la piel o por las mucosas de ojos, boca o nariz. Los insectos responsables de la transmisión vectorial pertenecen a la subfamilia Triatominae, dentro de la cual se han identificado aproximadamente 140 especies de 5 tribus, siendo 125 exclusivas en Latinoamérica y de las cuales 26 se han reportado en Colombia. El hábitat natural de los triatominos incluye palmeras, huecos en los árboles, grietas en las piedras, pequeñas cuevas y otros refugios de animales donde pueden encontrar alimento (60–62). Entre los principales vectores se encuentra *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus* en los países del cono sur, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en la región andina y partes de América Central, y *T. dimidiata* y *Triatoma barberi* en México (59). En Colombia, la encuesta nacional realizada, reveló que las especies con mayor riesgo de transmisión son *R. prolixus*, *T. dimidiata*, *T. maculata* y *T. venosa* (62)

2.1.2.2 Transmisión transfusional

Este tipo de transmisión se da por la donación y/o recepción de sangre contaminada con el parásito, este tipo de transmisión presenta una incidencia entre el 5 a 20% (63). Además, la infección transfusional se ha convertido en un serio problema en los países desarrollados no endémicos debido a la migración de poblaciones infectadas provenientes de regiones endémicas. El riesgo de adquirir la infección de 1 unidad de sangre de un donador infectado se encuentra entre el 10-20%. Adicionalmente, la población de riesgo está constituida principalmente por los individuos poli-transfundidos y los que reciben hemoderivados, dado que normalmente los procesos de centrifugación de componentes concentran los parásitos (59). En Colombia, desde el año 1995 se incluyó el diagnóstico obligatorio en todas las bolsas de sangre donadas en el país, estudios previos a la reglamentación mostraron una prevalencia de infección en bolsas de sangre entre 2.2% y 7.5% en tres ciudades del país: Bogotá, Cali y Cúcuta (64,65).

2.1.2.3 Transmisión vertical

La transmisión vertical tiene una prevalencia que varía entre el 0,1 y el 8% en las Américas y es de gran importancia dado que la infección vertical por *T. cruzi* puede dar lugar a abortos, nacimientos prematuros o lesiones fetales en el hígado, el bazo, el corazón y el sistema nervioso central. Aunque la infección por esta ruta no puede prevenirse o tratarse durante el embarazo, el diagnóstico precoz de la infección en el recién nacido facilita la administración del tratamiento, que en neonatos ha mostrado una tasa de curación cercana al 100% (66). En Colombia, la prevalencia global de infección por *T. cruzi* en gestantes de 5 departamentos endémicos fue 2,7%, siendo para cada departamento la siguiente: Casanare: 4,0%; Santander: 3,3%; Boyacá: 3,2%; Arauca: 2,1% y Meta: 0,2%, mientras que el rango entre los 63 municipios participantes osciló entre 0,0 y 20,2 (67,68).

2.1.2.4 Transmisión por trasplante de órganos

La transmisión por trasplante de órganos se ha reportado en trasplantes de corazón, hígado, médula, riñón y páncreas, con tasas de transmisión variables que alcanzan el 35% (69). En áreas endémicas es obligatorio el control serológico del donante y el receptor. El tratamiento antiparasitario de este último, en los casos seropositivos, debe considerarse por la posible reactivación de la infección por la inmunosupresión inducida debido al trasplante. En Colombia no existen reportes de este tipo de transmisión.

2.1.2.5 Transmisión Oral

El mecanismo de transmisión oral se considera el más antiguo, ya que permite la circulación y mantenimiento de *T. cruzi* en el ciclo silvestre. Se ha demostrado, que existe infección en mamíferos silvestres y roedores cuando se alimentan con triatomíneos infectados (66,70,71).

En el caso del humano, normalmente este tipo de transmisión genera brotes, es decir que la infección ocurre a más de una persona y está asociada con alguna fuente de alimentación. Desde el año 1965 que se reportó el primer caso humano asociado a transmisión oral, se han descrito en la literatura más de 1000 casos, distribuidos en aproximadamente 138 brotes, que principalmente han ocurrido en la Amazonia brasilera, también se han descrito en Colombia, Venezuela, Bolivia, Guyana Francesa, Argentina y Ecuador (33,72,73).

Una de las características más importantes de estos brotes es la elevada letalidad que normalmente se da por cuadros de miocarditis aguda que conducen a la muerte, se ha descrito una mortalidad entre el 8% y el 35% (66). Dentro de este mecanismo de transmisión, se han descrito diferentes formas que permiten la ingestión del parásito por el humano, la primera consiste en la ingestión accidental de triatominos infectados, alimentos o bebidas infectados con sus heces; la segunda la ingestión de carne o sangre de reservorios mamíferos infectados; la tercera la ingestión de leche materna de madres infectadas y la cuarta el consumo de alimentos o bebidas contaminados con secreciones de las glándulas anales de didélfidos infectados (71,74). Algunas cepas del parásito cuentan con la expresión de glicoproteínas de membrana que favorecen la transmisión oral, así la expresión de la glicoproteína gp82, confiere al parásito resistencia a la mucosa gástrica y disminuye la opsonización de anticuerpos específicos y adicionalmente la proteína gp90 que se comporta como modulador negativo de infectividad de las células, esta proteína es sensible a las pepsinas del jugo gástrico, por lo tanto al entrar en contacto con este, se degrada y por ende aumenta la capacidad invasiva del parásito explicando así la gravedad de la infección oral (71,72,75).

En Colombia, desde el año 1992 se han descrito 11 brotes de posible transmisión oral, con una letalidad del 16% (3). Los alimentos incriminados han sido principalmente vino de palma, jugo de naranja y mandarina, en cuanto a los vectores incriminados se han encontrado ejemplares de *Panstrongylus geniculatus* y *Rhodnius pallescens* y en cuanto a los reservorios se ha descrito la presencia de *Didelphis marsupialis* infectados en algunos brotes (28,73,76,77).

2.1.2.6 Transmisión accidental en el laboratorio

Se han descrito 65 casos de transmisión mediante accidentes en el laboratorio. La mayoría de los casos se han descrito en países de América del sur y ocurrieron vía parenteral con trypomastigotes en sangre de ratones infectados. Sólo 26 casos cuentan con información acerca de la sintomatología clínica desarrollada, de los cuales 34.6% desarrollaron síntomas a nivel cardiaco o neurológico e incluso se describe 1 caso con desenlace fatal por miocarditis (78).

2.1.3 Epidemiología

Trypanosoma cruzi causa la enfermedad de Chagas en América Latina, región en la que se calcula existen entre 6 y 8 millones de personas infectadas y aproximadamente 25 millones de personas en riesgo de contraer la infección. Sin embargo, en la actualidad y debido al alto número de migraciones, la enfermedad de Chagas se ha expandido a otras regiones como Australia, Europa y América del Norte, convirtiéndose en un problema grave en países no endémicos debido al aumento de migraciones (Figura 2) (1).

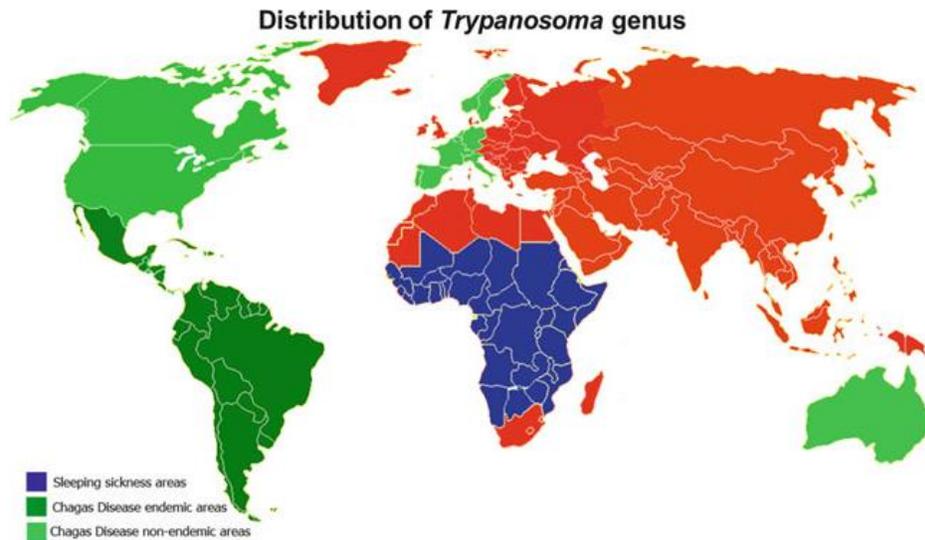


Figura 2. Distribución de enfermedad de Chagas y enfermedad del sueño en el mundo. Tomado de Rodrigues et al.,2014 (79).

En Colombia, existen aproximadamente 436.000 personas infectadas con *T. cruzi*, con una incidencia anual de 5.250 casos por transmisión vectorial y 1,000 casos por infección vertical, y una población en zonas endémicas cercana a los cinco millones de habitantes (1).

2.1.4 Ciclos de transmisión

2.1.4.1 Ciclo doméstico

El ciclo doméstico comprende la infección del hombre y la consecuente enfermedad de Chagas. Este ciclo es reciente en el contexto histórico y está definido por factores antroponóticos. La expansión de la enfermedad de Chagas después de la conquista de América es el producto de una ocupación errática y desprogramada de América Latina basada en las acciones del hombre sobre el ambiente, condiciones de vida y vivienda y fenómenos de migración hacia los centros urbanos. En este ciclo, el humano sobresale como principal hospedero de la infección, llevando al parásito hacia las zonas urbanas (70).

2.1.4.2 Ciclo peridoméstico

Se describe como las áreas cercanas de las viviendas, relacionadas con las actividades humanas como terrenos de cultivo, en lugares donde se apila madera y rocas. Comprende a mamíferos (roedores domésticos, marsupiales, gatos, perros) que habitan el peridomicilio y están en contacto cercano con el hombre y sus residencias, y los triatomíneos silvestres que son atraídos por el alimento y las luces de las casas (70).

2.1.4.3 Ciclo silvestre

El ciclo silvestre o primitivo es de naturaleza zoonótica. El protozoo circula entre los insectos vectores y los reservorios silvestres (mamíferos de pequeño y mediano porte) a lo largo de la mayor parte del continente americano desde hace millones de años. Los ecótopos primitivos de *T. cruzi* son muy diversos, encontrándose en los desiertos norteamericanos, altiplanos andinos, florestas amazónicas y atlántica. La tripanosomiasis silvestre prefiere ambientes ecológicamente cerrados o semiabiertos, variando en los hospederos y vectores dependiendo de una serie de factores como el clima, altitud, humedad, características fauno florísticas y disponibilidad de alimentos (70).

Existen alrededor de 180 especies de mamíferos pertenecientes a los siguientes ordenes: *Didelphidomorphia* (*Didelphis marsupialis*/zarigueya), *Lagomorpha* (*Sylvilagus floridanus*/conejo del norte), *Chiroptera* (*Molossus major*/murciélago), *Rodentia* (*Akodon sp*/ratón campestre), *Pilosa* (*Tamandua tetradactyla*/oso hormiguero), *Cingulata* (*Dasypus kapleri*/armadillo), *Carnivora* (*Cerdocyon thous azarae*/zorro), *Primata* (*Macaca mulatta*/mono rhesus), *Perisodactyla* (*Bos taurus*/toro), que se han encontrado naturalmente infectados por *T. cruzi*. (80)

2.1.5 Fases de la Enfermedad.

La enfermedad presenta tres períodos: fase aguda, fase crónica indeterminada o latente y fase crónica sintomática.

2.1.5.1 Fase aguda

El inicio de esta fase se da posterior al periodo de incubación, en el caso de transmisión vectorial, el período de incubación es de aproximadamente 4 a 15 días, en transmisión transfusional es de 8 a 120 días y en el caso de transmisión oral es de aproximadamente 3 a 22 días (66). Esta fase se caracteriza por presentar una elevada parasitemia detectable. Cerca del 90% de las personas infectadas no presentan sintomatología específica de la enfermedad. Normalmente es asintomática o los síntomas son leves e inespecíficos como fiebre prolongada, malestar general, astenia, irritabilidad, cefalea o linfocitosis atípicas. En algunos casos puede presentarse síntomas como síndrome febril, signos de puerta de entrada, Signo de Romaña que consiste en una inflamación bpalpebral unilateral indolora por el contacto de la conjuntiva con el parásito o chagoma de inoculación que consiste en la inflamación del sitio de la picadura del triatomino, por el contacto de éste con el parásito presente en las heces del triatomino (59,81). Pueden presentarse síntomas graves como miocarditis aguda,

meningoencefalitis, hepatomegalia, esplenomegalia y edema local o generalizado en aproximadamente el 1% de los casos, normalmente este tipo de síntomas se ven asociados en casos de transmisión oral y son muy poco frecuentes en casos de transmisión vectorial (59,72,74,81).

2.1.5.2 Fase crónica indeterminada

Posterior a la fase aguda, la parasitemia disminuye drásticamente entre las 4 y 8 semanas posteriores a la infección, debido al control ejercido por la respuesta inmune. Por esta razón, los pacientes entran en una fase crónica indeterminada que se caracteriza por la ausencia de sintomatología clínica, la baja parasitemia y la presencia de anticuerpos IgG contra el parásito, esta fase puede prolongarse entre 10 a 30 años (59,81).

2.1.5.3 Fase crónica cardíaca o sintomática

El 30-40% de los pacientes infectados pasan a la fase crónica sintomática que en la mayoría de los casos produce compromiso cardíaco generándose síntomas como palpitaciones y arritmias, trastornos de la conducción auriculoventricular y de la rama izquierda del corazón, taquicardia, fenómenos embólicos, cardiopatía dilatada y eventualmente pueden presentarse otras manifestaciones clínicas como las mega vísceras (megaesófago, megacolon) o incluso la combinación de la forma cardíaca y la digestiva (cardiodigestiva). Adicionalmente, puede presentarse compromiso del sistema nervioso central, usualmente en pacientes inmunosuprimidos (59,81). Durante esta fase permanece baja la parasitemia y continúa la presencia de anticuerpos IgG contra el parásito.

2.1.6 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas es diferente de acuerdo a la fase de la enfermedad. Durante la fase aguda la parasitemia es elevada, por lo tanto el objetivo del diagnóstico es la detección de tripomastigotes en sangre, principalmente mediante pruebas parasitológicas directas como frotis de sangre periférica, gota gruesa y métodos de concentración tales como el microhematocrito o Strout los cuales presentan sensibilidad de 80 a 90 % en pacientes con enfermedad de Chagas (31). También se pueden utilizar otros métodos directos como el hemocultivo y xenodiagnóstico, estos métodos permiten el aislamiento y la detección de parásitos, pero tardan mucho tiempo en proporcionar resultados (82,83).

Durante la fase crónica, la parasitemia es escasa, por ende los métodos directos tienen baja sensibilidad aproximadamente entre 20 y 50% (84). Razón por la cual, el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la fase crónica se realiza mediante pruebas serológicas que detectan anticuerpos IgG contra antígenos de *T. cruzi*. Los métodos serológicos más utilizados son las pruebas serológicas convencionales que incluyen, principalmente, los ensayos de IFI, ELISA y HAI, estos pueden emplear preparaciones de antígenos crudos o recombinantes (32,33). Algunos autores han reportado que las pruebas convencionales preparadas con antígenos

crudos pueden generar falsos positivos debido a reacciones cruzadas con *Leishmania spp* y *T.rangeli* (34,35).

Sin embargo, se ha reportado que la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA-convencional es de 97,7 % y 96,3% respectivamente, en tanto para la prueba de ELISA-recombinante la sensibilidad es del 99,3 % y la especificidad de 97,5% (6). Recientemente, se han desarrollado ensayos de inmunotransferencia, entre ellos el más importante es el TESA blot que consiste en la detección de anticuerpos contra antígenos de excreción-secreción y que ha mostrado elevada sensibilidad y especificidad (5,85,86).

Las herramientas moleculares también han sido aplicadas al diagnóstico de la enfermedad de Chagas, la PCR (qPCR y PCR convencional) ha sido ampliamente utilizada ya que permite realizar la detección de ADN del parásito en las fases aguda y crónica. Sin embargo, su utilidad se evidencia principalmente en la fase crónica y seguimiento post terapéutico debido a su capacidad para detectar bajas parasitemias.

En enfermedad de Chagas los métodos para realizar diagnóstico se dividen en directos e indirectos:

2.1.6.1 Métodos parasitológicos directos

- **Examen fresco:** Permite visualizar los parásitos circulantes en sangre periférica del paciente. La sensibilidad durante la fase aguda es menor al 50% y debe ser repetido varias veces, en diferentes muestras de un mismo paciente, para aumentar su sensibilidad (87).
- **Gota gruesa:** Esta técnica permite concentrar un mayor número de parásitos en un área reducida. Durante la fase aguda la sensibilidad puede alcanzar el 66% y la probabilidad de éxito se incrementa en función de número de veces que se repita (87).
- **Strout:** La técnica de concentración de Strout consiste en la obtención de una muestra de sangre anticoagulada a la cual se realiza retracción del coagulo, después de esto se toma el suero y se somete a una primera centrifugación de 500 rpm por 2 minutos y otra a 2000 rpm por 10 minutos, luego se retira el sobrenadante y se realiza un montaje directo en fresco o un extendido para coloración de la capa leucoplaquetaria (31,88,89).
- **Microstrout:** Se busca detectar los parásitos en la capa leucocitaria resultante de la centrifugación de capilares heparinizados con sangre del paciente, de 8000 a 12000 RPM y su observación bajo microscopio (31,87).

2.1.6.2 Métodos parasitológicos indirectos

- **Xenodiagnóstico:** este método se basa en la amplificación del parásito dentro del vector alimentado con sangre del paciente. Se utilizan ninfas de triatominos no infectados y la observación al microscopio del contenido intestinal se realiza entre 30 y 45 días después

de la ingestión. La sensibilidad del método durante la fase crónica puede llegar al 60% (90,91).

- **Hemocultivo:** esta técnica consiste en cultivar muestras de sangre del paciente. Existen diversos medios de cultivo que permiten el aislamiento de *T. cruzi*, algunos son de tipo celular por lo tanto permiten replicar el ciclo de parásito principalmente tripomastigote/amastigote, otros son bifásicos que contienen una fase sólida como agar sangre y una líquida como suero fetal bovino, y finalmente medios monofásicos cuyo principal exponente es el medio LIT (por sus siglas en inglés Liver Infusion Broth) en el cual crecen libremente las formas epimastigotes. Los cultivos son analizados al microscopio a los 20, 30 y 45 días buscando formas de epimastigotes (92).

- **Métodos serológicos :** El diagnóstico serológico se utiliza principalmente para la fase crónica, en la cual se diagnostica como positivo aquel paciente que presenta dos pruebas serológicas de diferente principio (1).
 1. **Inmunofluorescencia indirecta (IFI):** Técnica que permite determinar la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en suero. La técnica de IFI detecta la existencia de anticuerpos dirigidos a *T. cruzi*, frecuentemente formas de epimastigotes de cultivo, que son reconocidos por los anticuerpos de las personas infectadas. Un segundo anticuerpo, marcado con Isotiocianato de fluorescencia, reconoce al anticuerpo específico y permite visualizarlo al ser observado en un microscopio de fluorescencia.

 2. **Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA):** Es un método indirecto inmunoenzimático en fase sólida que permite la detección de anticuerpos contra *T. cruzi*. consiste en inmovilizar antígenos a una fase sólida sobre la cual se permite en una primera etapa la unión del anticuerpo. En una segunda etapa de la reacción, se añade un segundo anticuerpo acoplado a una enzima, permitiéndose la visualización de la reacción cuando se agrega el sustrato correspondiente.

 3. **TESA blot:** Es un ensayo de Western blot en el cual se utiliza un antígeno inmunodominante semi-purificado denominado TESA (Trypomastigote Excreted-Secreted Antigen), se pueden encontrar antígenos secretados en la fase aguda como el SAPA (Shed Acute Phase Antigen) que migran en una reacción de inmunotransferencia en la región 130 – 200kDa y en la fase crónica 150-160kDa (86,93).

2.1.6.3 Diagnóstico molecular

Se han utilizado varias secuencias diana para la detección de *T. cruzi* mediante PCR, que incluyen el gen Mini-exón, regiones constantes del ADNk (ADN de quinetoplasto), repeticiones de ADNst (ADN satélite nuclear) y genes que codifican para proteínas flagelares y el dominio variable LSU RNA. Sin embargo, los blancos ADNk y ADNst han sido los más

utilizados para el diagnóstico molecular debido a su elevado número de copias en el genoma de *T. cruzi* (5,7,94).

En el caso del ADNk, este ADN es extra nuclear y representa entre el 20-30% del ADN total del parásito, está formado por maxicírculos (1,6 Kpb) y minicírculos (1,4 Kpb) que forman una red compleja. En *T. cruzi*, cada minicírculo presenta cuatro regiones de secuencia altamente conservadas (120pb) y cuatro regiones hipervariables. Normalmente, los cebadores utilizados se anillan en las regiones de secuencia conservada delimitando las regiones variables, amplificándose estas últimas formándose un fragmento de 330pb para la amplificación de *T. cruzi* y en el caso de *T. rangeli*, se observan bandas entre 400 y 450 pb (Figura 3) (5,94).

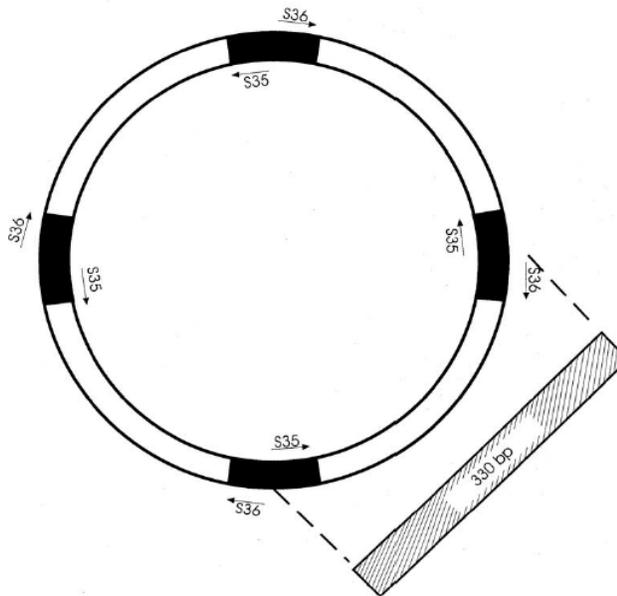


Figura 3. Representación esquemática de minicírculos de *T. cruzi*. Las áreas negras representan las cuatro regiones conservadas de 120 pb que contienen una secuencia de 12pb que es el sitio de origen de replicación. Se muestra los sitios de hibridización de los iniciadores 121 y 122 que amplifican un fragmento de 330 pb para *T. cruzi*. Tomado de Guhl et al.,2002 (94).

El ADN nuclear del *T. cruzi*, contiene 120.000 copias de una secuencia de 195 pb, lo que representa el 10% del ADN del parásito, por lo cual es una diana altamente sensible. Hasta el momento los iniciadores más utilizados para la amplificación de este blanco son cruzi 1 y cruzi 2 que amplifican un fragmento de 166 pb (94).

Se ha observado sensibilidad entre 51% y 70% para PCRk (PCR dirigida al ADN del quinetoplasto) y 22 y 75% para el PCRst (PCR dirigida al ADN satélite nuclear) en comparación con varias pruebas serológicas, entre ellas el TESA blot (5,6,95,96). Otros estudios muestran que la sensibilidad mejora de un 50% a 92,2%, con una especificidad de 97,7% cuando se utiliza clorhidrato de guanidina para el almacenamiento de las muestras (6).

Con el fin de estandarizar el diagnóstico molecular de *T. cruzi*, se desarrolló un estudio multicéntrico que contó con la participación de 16 laboratorios en Latinoamérica, en los que se evidenció que cuatro métodos de PCR distintos mostraron sensibilidades entre el 83,3% y el 94,4%, especificidades entre 85% y 95% y precisión entre 86,8% y 89,5% (7). Sin embargo, este estudio también mostró elevada variabilidad de la sensibilidad de acuerdo con el método de extracción, razón por la cual surgió la necesidad de usar un control de amplificación interno. Esto conllevó al diseño, estandarización y validación analítica de una técnica qPCR múltiple Taqman que permite la detección simultánea de ADNst o ADNk de *T. cruzi* y de una secuencia de ADN proveniente de *Arabidopsis thaliana* insertada en el plásmido pZero-2, añadida a cada muestra de sangre previo a la extracción de ADN (9,12).

2.1.7 Métodos para tipificación de *T. cruzi*

Para el análisis de la variabilidad genética de *T. cruzi*, se han utilizado varios marcadores y técnicas moleculares así como diferentes tipos de nomenclatura. Dentro de las diferentes técnicas moleculares, se destacan el MLEE (por sus siglas en inglés Multilocus Enzyme Electrophoresis), RAPD (por sus siglas en inglés random amplified polymorphic DNA), PCR-RFLP, análisis de fragmentos de PCR, PCR-HRM, MLMT y MLST (49).

Inicialmente hacía las décadas de los 70 y 80s se utilizó la técnica de MLEE, mediante el uso de esta técnica se describieron 3 grupos isoenzimáticos o zimodemas: Z1 y Z3 que se encontraron principalmente en reservorios, vectores de ciclo selvático y pacientes en fase aguda y Z2 que se encontró en los humanos infectados en el cono sur y en fase crónica (97–99). Posteriormente, se encontró la presencia de dos zimodemas adicionales que se nombraron Z2 boliviano (hoy TcV) y Z2 de Paraguay (hoy TcVI), debido a su estrecha relación con el zimodema Z2 encontrado en Brasil (100) y también dos variantes del zimodema Z3: Z3A (hoy TcIII) y Z3B (hoy TcIV) (101).

Posteriormente, se utilizó la técnica de RFLP dirigida al ADN de quinetoplasto, mediante la cual el parásito *T. cruzi*, fue clasificado en esquizodemas, los cuales presentaron concordancia con los zimodemas descritos previamente, además evidenciaron que la variabilidad genética también estaba presente a nivel mitocondrial y que una única cepa puede presentar varios genotipos clonales (102–104). Sin embargo, las técnicas de MLEE y RFLP, presentaban como limitación que requerían gran cantidad del parásito y su interpretación es muy compleja, por lo que en el caso de la RFLP para disminuir la cantidad inicial de ADN requerida se diseñó una técnica de PCR-RFLP dirigida a la región variable del quinetoplasto (105).

En el año 1993 Souto y Zingales, clasificaron a *T. cruzi* en dos linajes mediante la amplificación por PCR de una secuencia del dominio D7 del ADN ribosomal que codifica para la subunidad 24 α (ADNr 24 α), el Linaje I (125 pb) que corresponde con el Z2 y el linaje II (110 pb) que agrupa a Z1 y Z3, adicionalmente algunas cepas mostraron la presencia de las dos bandas (110 y 125 pb) denominadas grupo ½ (106).

En 1996, Souto y colaboradores, diseñaron una PCR multiplex que utiliza tres iniciadores para amplificar la región intergénica del gen mini-exón (SL-IR), dicha región presenta variabilidad en su tamaño y de tal forma permite clasificar las cepas en dos grupos el grupo Tc1 y Tc2, el grupo Tc1 correspondió al Z2 y el grupo Tc2 a los demás zimodemas descritos (107,108). Debido a que se habían realizado varias clasificaciones diferentes, en el simposio internacional de Rio de Janeiro se redefinieron los linajes en TcI y TcII, de tal forma que el TcI correspondía a aquellas cepas clasificadas como Z1, grupo 2 y a ciclos silvestres, mientras que las TcII correspondían a Z2 y grupo 1, adicionalmente Z3 y grupo ½ quedaron pendientes de clasificación (109). Luego, se definieron dos linajes filogenéticos el TcI que se consideró homogéneo y el TcII que se subdividió en 5 subgrupos (TcIIa-TcIIe) mediante MLEE, RAPD y análisis de secuencias de los fragmentos obtenidos mediante RAPD (110,111).

Posteriormente, en el año 2001 se planteó un algoritmo que permitió la discriminación de los seis grupos establecidos TcI- TcIIa-TcIIe, realizando análisis de tamaños de fragmentos obtenidos mediante la amplificación por PCR de SL-IR, ADN_r 24s α y ADN_r18s (112,113). En el año 2009, se unificaron todas las nomenclaturas que se habían descrito para *T. cruzi* mediante un consenso, en el que se estableció el término de DTU y se clasificó el parásito en 6 DTUs (TcI-TcVI). Adicionalmente, se reportaron varios estudios que indicaron la presencia de variabilidad genética de la DTU TcI, clasificándola en 5 genotipos (Ia-Ie) que a su vez fueron relacionados con ciclos epidemiológicos de transmisión mediante el uso de MLMT (51), adicionalmente se realizó secuenciación del SL-IR y se diseñó una técnica de PCR que permitió la amplificación de un fragmento específico del SL-IR y a su vez la discriminación de los 5 genotipos (114–116).

Dada la clasificación realizadas por DTUs, se propusieron varios algoritmos, entre ellos se encuentran el propuesto por Llewelyn y colaboradores en 2009 que permite la discriminación de las 6 DTUs mediante PCR del ADN_r 24s α y PCR-RFLP de los genes HSP-60 (por sus siglas en inglés heat shock protein) y GPI (por sus siglas en inglés glucose 6 phosphate isomerase) (117). También D' Avila y colaboradores en 2009 diseñaron un algoritmo que utilizaba PCR-RFLP de COII (por sus siglas en inglés cytochrome oxidase subunit 2) para discriminar TcI y TcII de las demás DTUs y la amplificación de los blancos SL-IR y ADN_r 24s α para discriminar las demás DTU's (118). Sin embargo, la limitación de estos algoritmos consiste en que al incluir PCR-RFLP de genes con bajo número de copias requieren gran cantidad de ADN y por ende aislamiento masivo del parásito.

Para optimizar la tipificación y que pudiera implementarse en muestras de sangre humana, se formularon varios algoritmos con modificaciones al propuesto por Brisse y colaboradores en 2001 (112), mediante la adición de otros blancos de ADN y técnicas como análisis de temperaturas melting, tales como las realizadas por Ramírez y colaboradores en 2010, que añadieron al algoritmo la amplificación del SL-IR para tipificación de la DTU TcI y diferencias de temperaturas melting posterior a la amplificación del ADN satélite nuclear para la discriminación de las DTUs TcIII y TcIV (48). También Burgos y colaboradores en

2010, añadieron otro blanco, una región del fragmento nuclear A10 que permite discriminar las DTUs TcII y TcIV con mayor precisión y la amplificación del SL-IR mediante PCR nested para clasificar las 6 DTUs en 3 grupos, el primero TcI, el segundo II, IV y V y el tercero III y VI (119).

Recientemente se han desarrollado algoritmos para discriminar las 6 DTUs, utilizando PCR en tiempo real, el primero utiliza el análisis de HRM posterior a la amplificación de los blancos SL-IR, ADN_r 24s α , ADN_r18s, permitiendo identificar cada DTU por la temperatura melting respectiva (22). El segundo, mediante sondas Taqman que permiten la amplificación de 4 blancos (SL-IR, ADN_r 24s α , ADN_r18s y COII) y la detección mediante sondas marcadas con diferentes fluoróforos y dirigidas a secuencias específicas que permiten la discriminación de las seis DTUs descritas(120).

También se han utilizados marcadores moleculares de alta resolución como lo son MLMT y MLST. Marcadores como MLMT son de gran utilidad en *T. cruzi* dado que los microsatélites son aproximadamente el 1% del genoma y se localizan generalmente en las regiones no expresadas del genoma nuclear, adicionalmente son marcadores de una locación y presentan sólo una copia por genoma haploide del parásito, permitiendo detectar los perfiles genéticos presentes en cada cepa (121), de tal forma que en el caso de las DTUs proporciona información más fina de la variabilidad genética, perfiles genéticos, si son poblaciones mono o policlonales y la presencia de híbridos. Es así como diferentes ensayos MLMT se han utilizado para determinar los perfiles genéticos y presencia de híbridos en las seis DTUs de parásitos presentes en diferentes tejidos infectados (122), también en el estudio de la elevada variabilidad genética de las DTUs TcI y TcIII, para el caso de la DTU TcI permitió evidenciar la presencia de un genotipo emergente y asociado con el ciclo doméstico denominado TcI-Doméstico (51,123) y para el caso de la DTU TcIII (TcIIc) se detectó su elevada variabilidad genética en América del sur y su posible relación con la generación de híbridos como el que dio origen a las DTUs TcV (TcIIId) y TcVI (TcIIe) (124). Adicionalmente, los análisis de MLMT han permitido conocer la variabilidad genética de las poblaciones de parásitos involucradas en brotes de posible transmisión oral en Colombia y Venezuela, con el fin de proporcionar información de las posibles fuentes de infección (28,125)

En cuanto a la técnica de MLST, esta se ha utilizado para el análisis de SNPs (single nucleotide polymorphisms) de genes nucleares y mitocondriales dentro de las DTUs, algunos de estos estudios han permitido conocer aspectos acerca del intercambio genético, formación de híbridos, origen y tipificación de las diferentes DTUs (27,53,126–129). Así como, la formulación de hipótesis acerca de sexualidad en lugar de clonalidad de *T. cruzi* y la confirmación de la presencia del genotipo reemergente TcI-Doméstico dentro de la DTU TcI (25,52,130).

2.1.8 Tratamiento

El tratamiento etiológico se realiza con Benzonidazol o Nifurtimox. En pacientes en fase aguda y pacientes en fase indeterminada temprana (niños menores de 18 años), se ha

observado que los medicamentos presentan una elevada eficacia, eliminando el parásito y produciendo negativización serológica (59,81,131,132). En la fase crónica se conoce poco acerca de la eficacia de estos medicamentos, debido a que el único criterio de curación es la negativización serológica, la cual ocurre muchos años después de iniciado el tratamiento en estos pacientes; por esta razón la técnica de PCR ha sido utilizada recientemente para realizar seguimiento post tratamiento evidenciando que el tratamiento con Benzonidazol en fase crónica produce disminución de la positividad de PCR entre un 66.3% y 95.0% (133,134).

2.2 LAS LEISHMANIASIS

2.2.1 Agente etiológico

Leishmania spp. es un protozoo flagelado intracelular obligado del humano y otros mamíferos (2). Dentro del género *Leishmania spp.* se han descrito cerca de 53 especies, 31 de ellas pueden infectar reservorios mamíferos y 20 son patógenas en humanos, todas las especies se agrupan en complejos de especies (10,40,135).

Las especies del parásito *Leishmania* pertenecen al reino Protista, clase *Kinetoplastea*, subclase *Metakinetoplastina*, orden *Trypanosomatida*, la familia de *Trypanosomatidae*, subfamilia *Leishmaninae*, y Género *Leishmania* (135). El género *Leishmania spp.* presenta dos divisiones *Paraleishmania* y *Euleishmania*, este último se divide en 4 subgéneros, de acuerdo al sitio de desarrollo del parásito en insectos de la familia *Psychodidae*: *Leishmania (Leishmania)* que se desarrolla en la porción anterior del intestino, *Leishmania (Viannia)* en la porción posterior del intestino, *Leishmania (Sauroleishmania)* relacionado con lagartos de acuerdo a recientes estudios de filogenia molecular y el complejo *Leishmania enrietti*. Dentro del grupo de Paraleishmanias, las especies descritas son *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. herreri*, *L. equatoriensis*, *L. colombiensis* y las descritas en el género *Endotrypanum*, estas especies se han descrito en diversos mamíferos y especies de flebótomos a excepción de *L. colombiensis* que se ha encontrado en infecciones humanas (Figura 4) (10,36,40,135–138).

La definición y clasificación de especies en los diferentes grupos y subgéneros se ha logrado mediante el uso de diferentes análisis, principalmente mediante MLEE y PCR-RFLP y también se ha utilizado la secuenciación de marcadores de ADN como la subunidad α de la ADN polimerasa, la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (139), el gen 7SL ARN (140), las regiones del espaciador transcrito interno ITS (141), el gen que codifica para la N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (NAGT) (142), el gen que codifica para el Citocromo b (143,144), y el gen que codifica para la proteína de choque térmico Hsp70 (145,146).

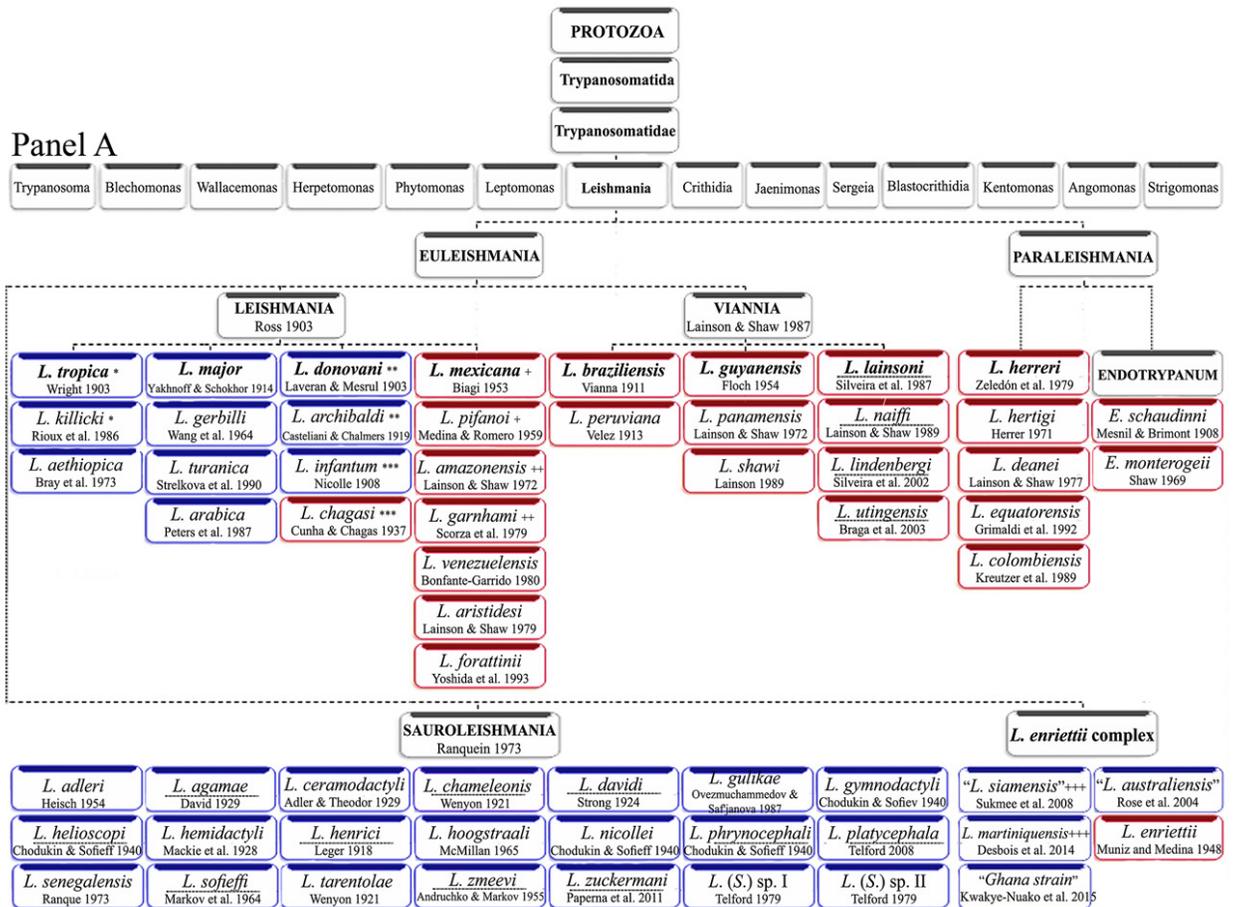


Figura 4. Clasificación taxonomica del género *Leishmania* spp.

2.2.1.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida transcurre en dos etapas, una en el hospedero invertebrado (dípteros hembras de la familia Psychodidae) y la que transcurre en los hospederos vertebrados (reservorios mamíferos o humanos). Adicionalmente, presenta dos formas celulares: los promastigotes que corresponden a la forma proliferativa que se encuentra en el intestino de los mosquitos flebótomos hembra, y los amastigotes que son la forma proliferativa se encuentra dentro de varios tipos de células hospedero de los humanos y otros mamíferos (Figura 5).

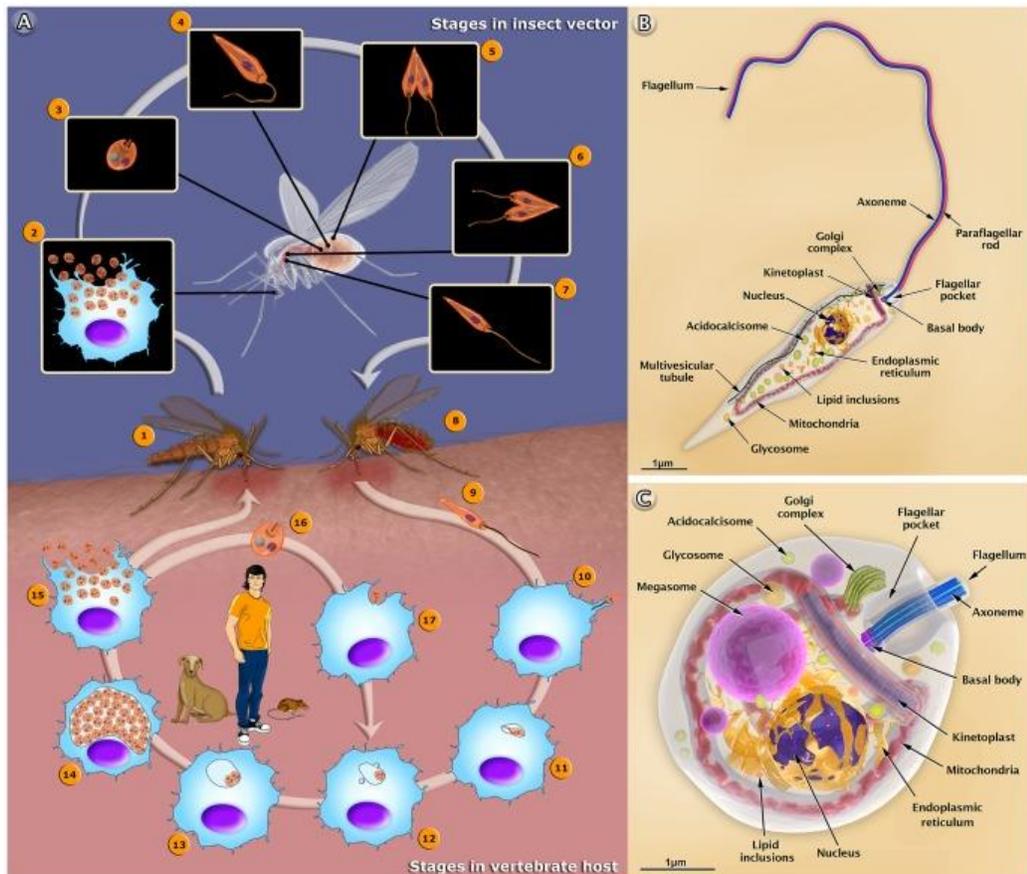


Figura 5. Ciclo de vida y formas celulares de *Leishmania* spp. (A) Ciclo de vida de *Leishmania* spp. 1. El insecto flebótomo hembra pica un mamífero infectado e ingiere su sangre y en ella ingiere 2. Macrófagos infectados con amastigotes 3. Formas amastigotes 4. En el intestino del vector los amastigotes adquieren la forma de promastigotes metacíclicos 5. Los promastigotes metacíclicos se reproducen en el intestino medio del insecto 6. Los promastigotes migran hacia la válvula estomodeal del intestino e inicia nuevamente la división celular 7. Los promastigotes adquieren la forma de en promastigotes metacíclicos infecciosos 8. El insecto pica nuevamente un hospedero mamífero y al ingerir su sangre libera los promastigotes mediante regurgitación 9. Promogastigotes metacíclicos 10. Los promogastigotes metacíclicos infectan los macrófagos formando una vacuola parasitófora 11. Los promogastigotes metacíclicos adquieren la forma de amastigotes dentro de la vacuola parasitófora 12. Los amastigotes se unen a la membrana de la vacuola 13. Los amastigotes se replican dentro de la vacuola 14. Hay replicación intensa de los amastigotes 15. Los amastigotes producen la lisis del macrófago 16. Forma amastigota 17. Los amastigotes infectan nuevos macrófagos (B) Organización estructural del promastigote (C) Organización estructural Amastigotes. Tomado de Teixeira et al.,2013 (147).

2.2.1.2 Diversidad de especies

Las especies de *Leishmania spp.* de importancia clínica se han logrado agrupar en 5 complejos que están en constante actualización: *L. donovani*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*. Adicionalmente, se encuentran las especies *L. major* en el viejo mundo y *L. colombiense* en el nuevo mundo que no se encuentran agrupadas en estos complejos, pero causan la infección en humanos (40,135). Dentro de los complejos, las especies presentan diferentes asociaciones con reservorios, manifestaciones clínicas de las leishmaniasis respuesta terapéutica y distribución en vectores.

- **Complejo *L. donovani*:** Comprende las especies *L. donovani*, *L. archibaldi* y *L. infantum*. Las especies *L. donovani* y *L. infantum* se asocian con leishmaniasis visceral y con leishmaniasis dérmica post-kala azar (PKDL) (79,148). Por otro lado, la especie *L. archibaldi* ha sido incluida en este complejo utilizando MLEE, más no se han utilizado otros marcadores moleculares para su tipificación (149). Finalmente, *L. donovani* corresponde a aquellas cepas que no sean clasificadas como *L. infantum*. (40).
- **Complejo *L. tropica*:** Este complejo está formado por las especies *L. aethiopica*, *L. tropica* y *L. killicki*. Para el caso de *L. aethiopica* y *L. tropica*, adicional a su tipificación mediante MLEE, también se ha descrito que han sido muy bien discriminadas mediante análisis de MLST (150). Adicionalmente, *L. tropica* se ha descrito en casos de leishmaniasis cutánea localizada y *L. aethiopica* en casos de leishmaniasis cutánea difusa y leishmaniasis mucocutánea (79,148). Este complejo, corresponde al foco geográfico del hemisferio oriental o viejo mundo. En cuanto a *L. killicki*, se ha sugerido que es una subespecie de *L. tropica* mediante PCR-RFLP de ITS y 21 marcadores microsatélites (151,152).
- **Complejo *L. mexicana*:** Está formado principalmente por las especies *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. garnhami* y *L. pifanoi*. Este complejo se ha descrito en el foco geográfico del nuevo mundo o hemisferio occidental. *L. amazonensis* se ha descrito en casos de leishmaniasis cutánea difusa y *L. mexicana* en casos de leishmaniasis cutánea localizada (79,148). Adicionalmente, mediante el uso de MLST de 7 marcadores moleculares diferentes y la secuenciación de *HSP-70* se ha podido evidenciar una fuerte agrupación de *L. mexicana* con *L. pifanoi* y de *L. amazonensis* con *L. garnhami* (40,145,153).
- **Complejo *L. guyanensis*:** Este complejo está integrado por las especies *L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. shawi* y corresponde a el foco geográfico del nuevo mundo. No existe una clara diferenciación para considerar independientes las tres especies, de hecho mediante dos estudios de MLST con genes como MPI, G6PDH, 6PGD (por sus siglas en inglés 6-phosphogluconate dehydrogenase) y uno de MLEE y RAPD se evidenció que no formaron grupos monofiléticos (24,153,154). Tanto *L. panamensis* como *L. guyanensis* están involucradas con la forma cutánea localizada y la mucocutánea de la enfermedad (79,148).

- **Complejo *L. braziliensis*:** En este complejo se encuentran las especies *L. braziliensis* y *L. peruviana*. Las especies fueron diferenciadas inicialmente mediante MLEE y RAPD (154). Sin embargo, con marcadores como MLST no se ha logrado dicha diferenciación de manera clara (24) y en otros estudios que utilizan como marcador la secuencia del gen *HSP-70*, se observa la aparición de dos grupos de *L. braziliensis*, actuando uno de ellos como un intermediario cercano a *L. peruviana*, por esta razón se sugiere que se use la secuencia de *HSP-70* o se realice el análisis de PCR en conjunto con otros marcadores moleculares como ADNk, CBP (por sus siglas en inglés serine carboxypeptidase) y MPI para diferenciar de manera clara las dos especies (145,153,155,156), esto dado que *L. braziliensis* puede producir la forma clínica mucocutánea y cutánea localizada (79,148).

Finalmente, en Colombia, la información con respecto a la distribución de especies se limita a tres estudios realizados principalmente en aislamientos obtenidos de pacientes con Leishmaniasis cutánea y mucocutánea, y solo un estudio de distribución de especies en todo el circuito epidemiológico, entendiéndose como circuito epidemiológico el formado por humanos, reservorios mamíferos e insectos vectores infectados por el parásito. Cabe resaltar que en todos los estudios realizados en Colombia la identificación de especies se realizó mediante la técnica de MLEE (157–159).

El estudio de Corredor y colaboradores en 1990, reporta la identificación de especies de *Leishmania* spp. en aislamientos de todo el circuito epidemiológico. Las frecuencias encontradas por especie fueron: *L. panamensis* (53.8%), *L. braziliensis* (30.3%), *L. infantum* (9.4%), *L. guyanensis* (2.6%), *L. amazonensis* (1.8%), *L. mexicana* (0.9%) y *Leishmania* spp. (1.2%) (157). Saravia y colaboradores en 1999, reportaron que *L. braziliensis* está ampliamente distribuida a lo largo del país, *L. panamensis* presentó mayor frecuencia en el occidente colombiano y *L. guyanensis* en las cuencas de los ríos Orinoco y Amazonas. Adicionalmente, en este estudio se analizaron zimodemos intraespecíficos en las tres especies reportadas, encontrándose que los zimodemos de *L. panamensis* fueron diferentes al comparar los del Norte y el Sur de la costa pacífica y el zimodemo 1.1 de *L. braziliensis* se asoció con mayor tiempo de evolución de la enfermedad mucocutánea (159).

Finalmente, el estudio más reciente reportado en Colombia, realizó la identificación de especies y distribución geográfica de 137 aislamientos obtenidos mediante la atención clínica de pacientes con leishmaniasis cutánea en el Instituto Nacional de dermatología Federico Lleras Acosta. Se reportaron las siguientes frecuencias de cada especie identificada: *Leishmania panamensis* 74.45%; *Leishmania braziliensis* 15.33%; *Leishmania guyanensis* 0.73%; Complejo *Leishmania mexicana* 3.65%, *Leishmania mexicana* 5.11%. Los pacientes provenían de los departamentos de Santander, Caldas, Cundinamarca, Caquetá, Cauca, Valle del Cauca y Casanare (158).

2.2.2 Mecanismos de transmisión

El principal mecanismo de transmisión es el vectorial, mediante la picadura de insectos hembra correspondientes a la familia *Psychodidae* y subfamilia *Phlebotominae*, dentro de

esta subfamilia se han descrito cerca de 800 especies, de las cuales aproximadamente 464 se han encontrado en el nuevo mundo o hemisferio occidental y 375 en el viejo mundo.

Adicionalmente, los flebotomos se han clasificado en 6 géneros de los cuales 3 se han descrito principalmente en el viejo mundo (*Phlebotomus* [13 subgéneros], *Sergentomyia* [diez subgéneros], y *Chinius* [cuatro especies]) y 3 en el nuevo mundo o países del hemisferio occidental (*Lutzomyia* [26 subgéneros y grupos], *Brumptomyia* [24 especies], y *Warileya* [seis especies]) (135).

En Colombia se han encontrado 163 especies de flebotomos que corresponden a los 3 géneros descritos en el nuevo mundo, de dichas especies 14 se han encontrado infectadas con parásitos del género *Leishmania spp.* Dentro de éstas 14 especies, 12 se han relacionado con leishmaniasis cutánea y mucocutánea y 2 con la forma visceral (*Lu. longipalpis* y *Lu. evansi*) (160).

Recientemente, en un estudio se evaluó la distribución de especies de flebotomos en Colombia y se encontraron 21 especies, 9 adicionales a las descritas anteriormente que son potencialmente vectores de *Leishmania spp.* en el país, ya que se encuentran ampliamente distribuidas en los sitios con mayor prevalencia de casos, dentro de las 21 especies detectadas las más importantes son *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia longipalpis*, *Psychodopygus panamensis*, *Psathyromyia shannoni* y *Pintomyia evansi* (161).

Sólo las hembras de los flebotominos se alimentan de sangre, normalmente se alimentan al amanecer y al anochecer y son atraídas a las viviendas humanas por la luz pero pican si se les molesta en sus escondites (madrigueras de animales, huecos en los árboles, cavernas, casas y demás lugares relativamente frescos y húmedos), durante el día (162).

Adicionalmente, se han descrito en la literatura de manera menos frecuente otras formas de transmisión. Se han reportado aproximadamente 11 casos de transmisión transfusional de los cuales 10 se han descrito en el viejo mundo por *L. donovani* (Francia, Suiza, Bélgica, Reino Unido e India) y 1 reporte en Brasil (163).

También, se ha descrito ampliamente la transmisión vertical, se han descrito cerca de 17 casos en la literatura en los que se evidencia la adquisición de leishmaniasis visceral durante el embarazo y por ende se observaron manifestaciones clínicas en los neonatos, también se han descrito casos de abortos asociados con la transmisión congénita o casos en los que la madre es portadora asintomática y el recién nacido adquiere el parásito. Los casos se han visto asociados con *L. infantum* y *L. donovani*, adicionalmente se han descrito casos de transmisión vertical en caninos y en modelos experimentales, en Brasil se han descrito dos casos principalmente (164–167).

Finalmente, también se han presentado casos de transmisión sexual en humanos y caninos principalmente asociados con *L. infantum* (165,168).

2.2.3 Epidemiología

Leishmania spp. es el agente causal de las leishmaniasis y afecta a 98 países, se han reportado cerca de 12 millones de personas infectadas, se estima que cada año se producen 1.3 millones de nuevos casos y entre 20.000 y 40.000 defunciones (2,160).

Más del 90% de los casos mundiales de leishmaniasis visceral se producen en sólo seis países: India, Bangladesh, Sudán, Sudán del Sur, Brasil y Etiopía. La leishmaniasis cutánea está más ampliamente distribuida, con alrededor de un tercio de los casos en tres regiones diferentes, las Américas, la cuenca mediterránea y Asia occidental desde el Oriente Medio hasta Asia Central. Los diez países con mayor frecuencia de casos estimados son Afganistán, Argelia, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopía, Sudán del Norte, Costa Rica y Perú, que en conjunto representan entre el 70 y el 75% de la incidencia mundial estimada de la leishmaniasis cutánea (2).

En las Américas, las leishmaniasis cutánea y mucocutánea constituyen un grave problema de salud pública ya que son endémicas en 22 países donde las especies del subgénero *L. Viannia* causan la mayoría de casos de leishmaniasis cutánea, anualmente se reportan 66.941 casos, con una incidencia anual estimada de 187.200 a 307.800. Adicionalmente, se reportan anualmente 3.662 casos de leishmaniasis visceral, con incidencia anual estimada de 4.500 a 6.800 casos (2).

Colombia cuenta con 7 de las 20 especies de *Leishmania spp.* asociadas con manifestaciones clínicas de la leishmaniasis, hecho que lo convierte en uno de los tres países con el mayor número de especies y ocupa el segundo lugar en incidencia de Leishmaniasis en América después de Brasil, pasando de 6.000 a 20.000 el número de casos anuales entre el 2003 y 2006 (157,160). Adicionalmente, durante el periodo comprendido entre 2004-2008 se reportaron 60 casos de leishmaniasis visceral con una incidencia anual estimada entre 70 y 110 casos y en el periodo entre 2005-2009 se reportaron 17.420 casos anuales de leishmaniasis cutánea (2).

En Colombia, la enfermedad predomina en gran parte del país (Figura 6), especialmente en los focos silvestres y en los valles interandinos, donde parece que trabajar en las plantaciones de café es un factor de riesgo (169). Los brotes epidémicos de leishmaniasis cutánea han sido reportados desde 1984 y causados por *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis*, con transmisión intra y peridomiciliar (160,170). El mayor brote de leishmaniasis cutánea se produjo durante los años 2005-2009, con más de 35.000 casos en las fuerzas militares, el 80% causado por *L. braziliensis* y el 20% restante por *L. panamensis*. Otro brote importante, que afectó a la población civil, se produjo en los valles andinos en el período 2003-2004, con 2.810 casos de leishmaniasis cutánea causados por *L. guyanensis* (160).

En Colombia, la leishmaniasis visceral ha sido causada por *L. infantum*. Existen dos focos claramente identificados: el primero y más importante se encuentra en la costa norte, donde *Lu. evansi* es el principal vector. El segundo foco se encuentra en el valle del río Magdalena,

donde *Lu. longipalpis* es el principal vector. La mayoría de los casos (89%) ocurren en niños menores de cinco años de edad (160).

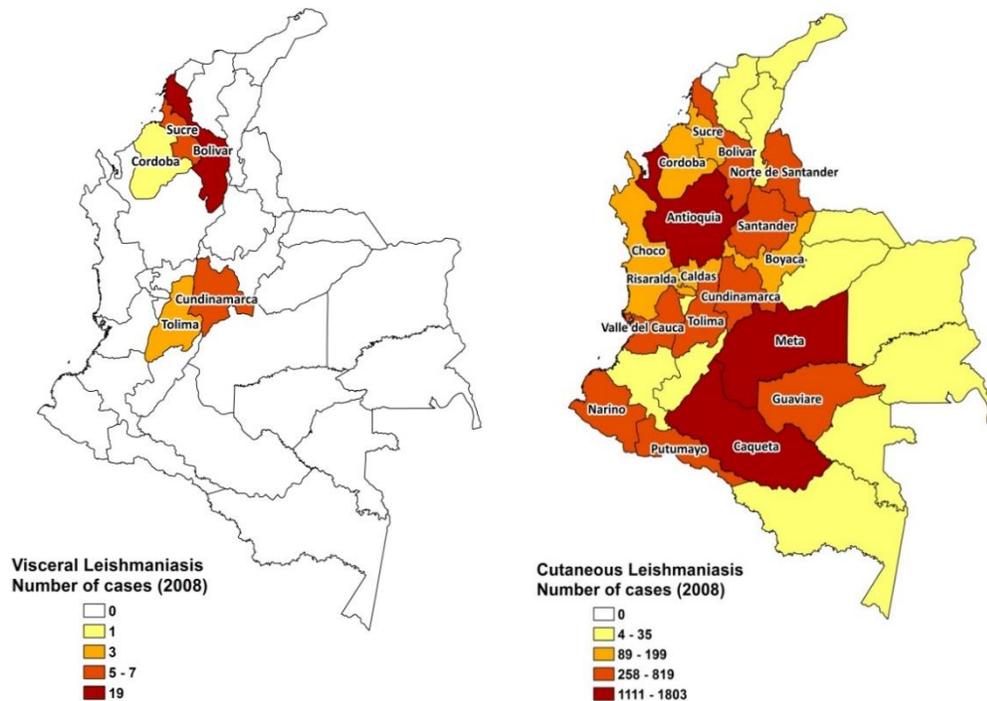


Figura 6. Distribución de casos de leishmaniasis visceral y leishmaniasis cutánea en Colombia en el año 2008. Tomado de Alvar et al., 2012 (160).

2.2.4 Formas clínicas de la enfermedad

Las manifestaciones clínicas de las leishmaniasis se clasifican en leishmaniasis tegumentaria y leishmaniasis visceral. La leishmaniasis tegumentaria se clasifica en leishmaniasis cutánea y leishmaniasis mucocutánea (2,171).

2.2.4.1 Leishmaniasis tegumentaria

La leishmaniasis tegumentaria se clasifica en leishmaniasis cutánea y leishmaniasis mucocutánea (2,171). La leishmaniasis cutánea es la forma clínica más prevalente de las leishmaniasis en el nuevo mundo y se clasifica en dos formas clínicas, la leishmaniasis cutánea localizada y la leishmaniasis cutánea difusa.

- **Leishmaniasis cutánea localizada:** se caracteriza por la presencia de úlceras, nódulos lisos, placas planas o lesiones hiperqueratósicas similares a las verrugas en piel, que ocurren en el sitio de picadura del insecto y pueden sanar espontáneamente, sin embargo el periodo de curación varía de acuerdo a la especie involucrada en la infección (79,162,171).

- **Leishmaniasis cutánea difusa:** se produce debido a que los parásitos se propagan a través de los vasos linfáticos y producen nódulos que no se ulceran, pero se dispersan ampliamente por la piel, esta forma clínica está principalmente asociada con *L. amazonensis* en el nuevo mundo y *L. aethiopica* en el viejo mundo (79,162,171).
- **La leishmaniasis mucocutánea:** consiste en eritema y ulceraciones en los orificios nasales, seguidos por inflamación destructiva que puede extenderse hasta afectar el septo nasal y en algunos casos, la faringe o la laringe. La inflamación puede perforar el septo nasal, desfigurar gravemente el rostro o bloquear la faringe y/o la laringe (79,162,171).

2.2.4.2 Leishmaniasis visceral

Constituye la forma clínica más severa, es altamente endémica en el viejo mundo, puede incluso causar la muerte ya que consiste en la afección de órganos como el bazo, hígado y médula ósea. Los síntomas más comunes son fiebre ondulante prolongada, pérdida de peso, disminución del apetito, signos de anemia, leucopenia, trombocitopenia y distensión abdominal con esplenomegalia y hepatomegalia. Es considerada una infección oportunista en pacientes inmunosuprimidos (79,162,171).

2.2.5 Diagnóstico

El amplio espectro clínico de la leishmaniasis y la cantidad de especies del parásito que producen infección, hacen que el diagnóstico de la enfermedad sea complicado. Las leishmaniasis presentan cuadros clínicos distintos que pueden ser causados por diferentes especies y también atribuibles a infecciones mixtas de especies independientes (11). El estándar de oro para diagnóstico de las leishmaniasis cutánea es la observación microscópica del parásito en biopsias de lesión o aspirados y frotis teñidos con Giemsa, debido a la elevada especificidad que proporcionan. Sin embargo, estas técnicas presentan limitaciones como el hecho de que solo detectan género y su baja sensibilidad ya que esta depende del número y la dispersión de los parásitos en la muestra analizada, el procedimiento de toma de muestra y la experticia del operador (10,39).

El diagnóstico serológico es útil principalmente en casos de leishmaniasis visceral, se utilizan pruebas como ELISA e IFI para detección de anticuerpos, que han mostrado sensibilidad entre 80-100% y especificidad entre 77-100% y pruebas de aglutinación para detección de antígenos, estas pruebas han mostrado sensibilidad entre 79-100% y especificidad del 60-100% (38,39). En el caso de leishmaniasis cutánea, las pruebas serológicas no muestran un buen rendimiento ya que la sensibilidad es muy variable y el número de anticuerpos circulantes tiende a ser bajo (11,37). La especificidad es el punto más crítico en el diagnóstico serológico de las leishmaniasis porque en la mayoría de las áreas endémicas de leishmaniasis, coexiste *T. cruzi* y *T. brucei*, permitiendo que se den reacciones cruzadas y por ende resultados falsos positivos (34,35). Adicionalmente, se encuentra la prueba cutánea de Montenegro que se utiliza para diagnóstico de leishmaniasis cutánea, esta prueba es muy

sencilla y se ha utilizado ampliamente debido a su elevada sensibilidad y especificidad. Sin embargo, las desventajas de la prueba de Montenegro son que requiere producción en masa del antígeno, la sensibilidad varía según la calidad del antígeno y no logra diferenciar entre una infección pasada y presente (39).

Herramientas de biología molecular han sido implementadas con el fin de realizar diagnóstico de infección por *Leishmania* y discriminación de especies. El análisis mediante PCR ha sido implementado con éxito y ha demostrado ser la herramienta molecular más sensible para la detección directa y caracterización de especies de *Leishmania spp* en muestras clínicas de todas las formas clínicas, adicionalmente proporciona el diagnóstico rápidamente ya que no requiere el aislamiento del parásito en cultivo (10).

Actualmente se utiliza una amplia gama de blancos para detectar *Leishmania spp.* mediante PCR, entre ellos, podemos encontrar el Espaciador Transcrito Interno 1 (ITS1), ADN del quinetoplasto (ADNk), la unidad pequeña ribosomal o rRNA (SSU rDNA), la proteína de choque térmico 70 (HSP70), 7SL ARNr (7SL) y la subunidad ribosomal 18S (10,11).

Estos blancos se han utilizado en diferentes formatos de PCR: convencional, tiempo real y LAMP, presentan una elevada sensibilidad en comparación con las pruebas serológicas para la detección del parásito en las formas cutáneas y mucocutáneas, particularmente en pacientes con leishmaniasis cutánea crónica, en los que las parasitemias son muy bajas y las técnicas de PCR han mostrado sensibilidad del 100.0% (11,37). Adicionalmente, las técnicas moleculares han sido muy útiles para realizar el seguimiento de la eficacia al tratamiento y detección de recaídas (11).

La técnica de PCR más utilizada para diagnóstico molecular hasta el momento, ha sido la PCR convencional, que ha mostrado una sensibilidad entre el 60.0% y 100.0% y una especificidad del 100.0%, en biopsias de piel, aspirados de órganos y muestras de sangre de pacientes con leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. Sin embargo, estos valores son dependientes de diversos factores, tales como el método de extracción de ADN empleado, la calidad de las muestras y la cantidad de copias del blanco seleccionado. Los valores de sensibilidad más elevados (Mayores al 90.0%) se han obtenido mediante el uso de los blancos ADNk, *HSP-70* y 18S (172–178).

Adicionalmente, con el fin de mejorar la sensibilidad y obtener información acerca de la carga parasitaria en sangre y tejidos de pacientes infectados con el parásito, se han formulado ensayos de qPCR dirigidas a blancos como ADN polimerasa, GPI, G6PD, ADNk y 18s, los cuales evidencian una sensibilidad superior al 95.0% (179–183)

Finalmente, los trabajos más recientes se refieren a la técnica de LAMP, dado que es una técnica que permite la detección del parásito en campo, no requiere termociclador y su amplificación en lazo formando bucles le confiere mayor sensibilidad y especificidad, se han utilizado los blancos 18s y ADNk inicialmente en cepas, muestras de flebotomos y caninos y recientemente en muestras humanas de leishmaniasis visceral y leishmaniasis cutánea, con

el blanco ADNk se ha evidenciado sensibilidad superior al 90.0% para leishmaniasis visceral (11,13–16,18,184–188).

2.2.6 Métodos moleculares para tipificación de especies de *Leishmania spp.*

Para diferenciar las especies de *Leishmania spp.*, se utilizan diversas características biológicas, bioquímicas, moleculares e inmunológicas. El estándar de oro es la técnica bioquímica de MLEE, sin embargo, esta técnica presenta limitaciones tales como que requiere aislamiento en masa del parásito, es una técnica dispendiosa, costosa y la interpretación de los resultados es compleja.

Por esto, actualmente se utiliza una amplia gama de técnicas moleculares que permiten detectar diversos blancos para discriminar las especies del género *Leishmania spp.*, entre dichos blancos, podemos encontrar la subunidad α de la ADN polimerasa, la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (139), el gen 7SL ARN (140), el espaciador transcrito interno 1 (ITS1) y el espaciador transcrito interno 2, ADN del quinoplasto (ADNk), el gen miniexón, la unidad pequeña ribosomal o rRNA (SSU rDNA), la proteína de choque térmico 70 (Hsp-70), 7SL ARNr (7SL), el gen que codifica para la N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa (NAGT), el gen glucosa fosfato deshidrogenasa GPDH, el gen que codifica para la glicoproteína de superficie GP63 y el gen que codifica para el citocromo b, estos genes permiten realizar la identificación de especies mediante análisis de sus secuencias, ensayos de PCR-RFLP, PCR-HRM y PCR especie específica (10,40,140,143–146,153,154,156,162,168,189–194).

Adicionalmente, dentro de los ensayos más utilizados para la identificación de especies se encuentra el PCR-RFLP que ha sido aplicado a los genes ITS-1, ADNk y *HSP-70*. La restricción de la región ITS y del ADNk, permite la diferenciación de todas las especies de *Leishmania spp.* Sin embargo, los perfiles de restricción de los integrantes del complejo *L. donovani* y del complejo *L. braziliensis*, son muy parecidos (195). Para el caso de *HSP-70*, la restricción con *Hae III*, es muy útil para el subgénero *L. (Viannia)*, mientras su sensibilidad es muy baja para el subgénero *L. (Leishmania)* (194).

La técnica de PCR-RFLP, es una técnica dispendiosa y los perfiles electroforéticos obtenidos son de difícil interpretación y no son reproducibles en diferentes laboratorios. Por estas limitaciones, se han implementado técnicas de PCR-HRM y análisis de denaturación con sondas FRET (por sus siglas en inglés fluorescence resonance energy transfer) que han permitido la discriminación de especies de manera más robusta y rápida (23,196).

El PCR-HRM (análisis de alta resolución de temperatura de fusión), es una técnica que permite la amplificación y posterior análisis de las curvas de fusión de un producto de PCR de manera simultánea, para la detección de variaciones mínimas en el ADN como mutaciones, polimorfismos de nucleótido sencillo y cambios epigenéticos. La técnica consiste en la amplificación del ADN de interés mediante qPCR, en presencia de un agente intercalante de ADN de doble cadena que emite fluorescencia, como el SYBR Green, Eva

Green o Melt doctor. El producto posteriormente es desnaturalizado mediante el aumento gradual de la temperatura lo que genera la liberación de fluorescencia que es monitoreada durante la fusión del producto. El producto de doble cadena de ADN emitirá fuertemente fluorescencia a bajas temperaturas, pero a medida que esta última aumenta, la fluorescencia disminuye al principio, lentamente y la tasa de disminución de la fluorescencia es generalmente más grande cerca de la temperatura de fusión (T_m) del producto de PCR. El T_m depende de la secuencia, el contenido de GC y del tamaño del producto de PCR y se define como el punto de la curva de fusión en donde el 50% del ADN es de doble cadena, y el 50% es de una sola cadena. En las curvas de fusión se grafica la fluorescencia en función de la temperatura en donde se observa la T_m como un punto de inflexión o también se puede observar como un pico en una gráfica de primera derivada, en esta gráfica la presencia de otros picos de menor intensidad pueden observarse y evidencian la presencia de productos inespecíficos (197,198).

La secuenciación de genes también se ha utilizado para clasificación de especies, dentro de los genes más utilizados se encuentra el *citocromo b*. El *citocromo b* proporciona como ventaja que es un marcador mitocondrial y por ende, uniparental con escasa heterocigosidad, por lo tanto, es muy informativo, no solo para discriminación de especies de *Leishmania spp.* sino también para estudios filogenéticos y adicionalmente presenta de 25 a 50 copias por célula por lo que proporciona alta sensibilidad lo que permite que pueda ser utilizado en muestras clínicas sin necesidad de aislamiento previo (40,199).

El gen *citocromo b* es codificado en los maxicírculos del quinetoplasto y participa en el proceso de transporte de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial que para el caso de *Leishmania spp.* ha sido utilizado en varios estudios, entre los estudios pioneros se encuentran los realizados por Luyo-Acero y colaboradores en 2004 y Marco y colaboradores en 2006, en los que se utilizó la secuencia del gen *citocromo b* inicialmente para análisis filogenéticos y se comparó con el estándar de oro MLEE y la clasificación realizada por Lainson y Shaw (1987), encontrándose alta concordancia en cuanto a especies del viejo mundo (200,201).

Posteriormente, se realizó análisis de secuencia del gen *citocromo b* en especies del nuevo mundo, viejo mundo, patógenas y no patógenas de humanos, encontrándose de nuevo alta similitud con el estándar de oro MLEE y la clasificación de Lainson y Shaw (1987) (143). Por lo anterior, se reconoce el gen *citocromo b* por su capacidad de discriminar exitosamente las especies de *Leishmania spp.* y ha sido aplicado en aislamientos, muestras clínicas de *Leishmania spp.* e incluso en flebotomos. Cabe resaltar que en los estudios realizados se ha encontrado que no hay diferencia entre las secuencias de *L. donovani* y *L. infantum*, las especies *L. braziliensis* y *L. peruviana* y permite identificar fácilmente la especie *L. siamensis* (144,199,202–204).

También se han utilizado marcadores moleculares de alta resolución como el MLMT y el MLST. Se han realizado ensayos de MLMT para identificación de especies de los complejos

L. donovani y *L. tropica* y para las especies del subgénero *L. (Viannia)* y ha sido de gran utilidad para el estudio de variabilidad intraespecífica de *L. infantum* (205–207).

En cuanto al MLST, para el complejo *L. donovani* se realizó secuenciación de 5 genes, ICD (isocitrato dehidrogenasa), ME (por sus siglas en inglés cytosolic malic enzyme), MPI (por sus siglas en inglés mannose phosphate isomerase), G6PDH (por sus siglas en inglés glucose-6-phosphate dehydrogenase) y FH (por sus siglas en inglés fumarate hydratase) que codifican para enzimas utilizadas previamente para análisis mediante MLEE, se encontró correlación entre la variabilidad genética y los perfiles de movilidad electroforética que previamente han sido obtenidos para las especies del complejo por MLEE y se proporcionó información adicional acerca del intercambio genético en el complejo *L. donovani* y su relación con la distribución geográfica de los aislamientos analizados (208). La técnica de MLST también ha sido utilizada para análisis de la discriminación de especies, filogenia, taxonomía y genética de poblaciones de las especies de *L. (Viannia)*, (24,209).

Adicionalmente, MLST se ha utilizado para investigación de brotes de leishmaniasis en Brasil causados por *L. braziliensis*, en los que esta técnica permitió identificar la participación y dispersión de 3 complejos clónales de esta especie en los brotes ocurridos en diferentes ciudades brasileñas (26).

2.2.7 Tratamiento

El tratamiento de primera línea para las leishmaniasis, se basa en la administración de sales de antimonio pentavalente (Sb5+) como el antimoniato de N-metil meglumina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio.

En casos especiales en los que no se pueden utilizar o se presentan falla terapéutica a los medicamentos de primera línea como segunda elección se consideran el isotianato de pentamidina que ha generado buenos resultados en el tratamiento de las especies *L. panamensis* y *L. braziliensis*, la miltefosina que ha mostrado mayor eficacia en leishmaniasis cutánea por *L. panamensis* y la anfotericina B que es utilizada en casos de leishmaniasis visceral y mucocutánea (210–212).

Se ha reportado respuesta diferencial al tratamiento con antimoniales pentavalentes, especialmente en *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana*, encontrándose mayor porcentaje de falla terapéutica en *L. braziliensis* (30.4%), seguido de *L. peruviana* (24.5%) y menor falla en *L. guyanensis* (8.3%) (213,214)

2.2.8 Ciclo de transmisión

La leishmaniasis es una antrozoonosis, en la cual el humano es un hospedero accidental. La mayoría de las infecciones son de origen zoonótico, aunque en el caso de *L. donovani* se ha reportado transmisión antroponótica. La transmisión de las leishmaniasis ocurre principalmente en focos silvestres (79,162,171)

2.2.8.1 Ciclo silvestre

En este ciclo la transmisión ocurre entre insectos *Psychodidae* y mamíferos silvestres en el que la infección humana es accidental, una de las especies que se ha visto incriminada en este ciclo epidemiológico es *L. braziliensis*.

2.2.8.2 Ciclo peridoméstico

La infección ocurre entre animales domésticos o peridomésticos y los insectos flebótomos.

2.2.8.3 Ciclo doméstico

Este ciclo es estrictamente antroponótico y ocurre entre los insectos vectores y el humano, por ejemplo, la especie *L. donovani* puede transmitirse en este ciclo.

La descripción de los ciclos es compleja ya que hay algunas características particulares a cada especie, por ejemplo, el principal reservorio animal de *L. braziliensis* es desconocido (215). Adicionalmente, *L. braziliensis*, descrita como una zoonosis en bosques primarios, también, se ha visto que produce casos en áreas pobladas resultantes de la deforestación y el desarrollo agrícola y en zonas periurbanas (162).

El ciclo de una especie de *Leishmania spp.* no se limita a un entorno específico, ya que una sola especie se puede encontrar en entornos muy diferentes. Un ejemplo importante es *L. infantum*, que está presente en los dos focos geográficos nuevo y viejo mundo (216,217) y *L. guyanensis* que está presente en los Andes peruanos y en la selva tropical en numerosos países de América del Sur. Por lo anterior, una sola especie del parásito puede estar asociada con múltiples especies de la familia *Psychodidae*, por ejemplo, en el caso de *L. infantum* se ha aislado de *Phlebotomus perniciosus* en el "viejo mundo" y de *Lutzomyia longipalpis* en el "Nuevo Mundo" (218,219). Aunque se ha descrito que el vector de *L. guyanensis* es *Lu. umbratilis*, también se ha aislado de *Lu. peruviansis*.

Los cánidos domésticos parecen ser los reservorios para *L. infantum*, y son los reservorios más importantes en la permanencia de este parásito en los ciclos domésticos. También ocurre en varios cánidos silvestres, tales como los lobos, zorros, chacales y zorros grises. Se han informado casos de infección con *L. infantum* en una amplia variedad de animales domésticos y silvestres como los gatos, équidos, agutíes silvestres (*Dasyprocta agouti*), zarigüeya de orejas blancas (*Didelphis albiventris*), mangostas egipcias (*Herpestes ichneumon*), ginetas (*Geneta geneta*), lince ibérico (*Lynx pardinus*), roedores, una foca y al menos una especie de murciélagos (*Carollia perspicillata*). Algunas de estas especies como también los gatos, podrían actuar como reservorios secundarios en algunas áreas (79,162,171).

Los reservorios importantes para especies de *Leishmania spp.* del Nuevo Mundo incluyen los osos perezosos para *L. guyanensis/ L. panamensis*, los armadillos para *L. naiffi* y los

roedores para *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. lainsoni*. Los marsupiales, incluidos los miembros de los géneros *Didelphis*, *Philander*, *Marmosa*, *Caluromys* y *Metachirus*, y el zorro de monte también se pueden infectar con *L. amazonensis*, aunque se cree que los roedores son los reservorios primarios. Los perros son el único reservorio conocido para *L. peruviana*, que causa leishmaniasis cutánea humana en los Andes peruanos. Se sospecha que los mamíferos arbóreos son el reservorio para *L. shawi*, que se ha informado en monos (el sakí de barba negra, *Chiropotes satanas*), los osos perezosos (*Choloepus didactylus* y *Bradypus tridactylus*) y los coatíes (*Nasua nasua*). Se desconocen los reservorios para *L. venezuelensis*, que se ha informado en humanos y gatos. Los humanos son el principal reservorio para dos especies del Viejo Mundo: *L. tropica*, que causa leishmaniasis cutánea y *L. donovani*, que causa leishmaniasis visceral (79,162,171).

Finalmente, la diversidad de ambientes favorece la capacidad de *Leishmania* para adaptarse a diferentes hospederos vertebrados; algunas especies se han aislado de una amplia gama de hospederos mamíferos (220). Otro factor de complicación en la descripción de ciclos epidemiológicos es la posible presencia de varias especies de *Leishmania spp.* en un solo foco de leishmaniasis y por lo tanto a veces en un único hospedero. Estas diversas características podrían haber desempeñado un importante papel en la diversificación de la población de *Leishmania spp.* y en la especiación (79,162,171).

3 JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas y las leishmaniasis, pertenecen al grupo de enfermedades tropicales desatendidas, es decir, enfermedades que afectan principalmente a las poblaciones más vulnerables y con el menor acceso a los servicios de salud. Las dos enfermedades causan la pérdida de aproximadamente 4 millones de años de vida ajustados por discapacidad (AVADs). Se calcula que existen 21 millones de personas infectadas y que producen cerca de dos millones de casos nuevos por año en el mundo (221).

Adicionalmente, el continuo cambio climático y el aumento de las migraciones por desplazamiento forzado que actualmente enfrenta el país, han generado cambios en la distribución de vectores que propician la aparición de nuevos escenarios de transmisión, incrementando así el número de casos y generando brotes, los cuales en el caso de enfermedad de Chagas son de gran importancia, dada la elevada letalidad (16%) (3) y en el caso de las leishmaniasis, por el elevado número de casos que llegan a producirse, por ejemplo, en el reciente brote de Chaparral, Tolima se presentaron 2810 casos de Leishmaniasis cutánea en un año (170).

Las dos antropozoonosis tienen en común las zonas geográficas en las que se presentan en Colombia, los dos parásitos tienen en común gran parte de los reservorios mamíferos que infectan, en el caso de la leishmaniasis visceral y Chagas agudo presentan algunos síntomas en común y en las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de las dos enfermedades pueden presentar reacciones cruzadas, todos estos factores generan que haya confusión en el adecuado diagnóstico y manejo de estas parasitosis en el país.

En cuanto al diagnóstico son varias las dificultades, las técnicas directas para la detección de los dos parásitos son dependientes de la experticia operador y por ende la principal dificultad es que los bacteriólogos no reconocen fácilmente la morfología del parásito, otra dificultad es que las pruebas serológicas pueden presentar reacciones cruzadas entre los dos parásitos, especialmente, cuando se realizan utilizando antígenos crudos.

Las contribuciones científicas que apunten a facilitar el acceso al adecuado diagnóstico, diagnóstico diferencial y al entendimiento de las dinámicas de transmisión de estas enfermedades son de vital importancia. En Colombia, a pesar de la elevada prevalencia de la enfermedad de Chagas y las leishmaniasis, existen vacíos en el conocimiento en cuanto a su diagnóstico y los determinantes genéticos de los parásitos circulantes en el país.

En Colombia, el diagnóstico de las dos parasitosis, se encuentra centralizado en el Instituto Nacional de Salud (INS) que se encarga de la transferencia de las técnicas de diagnóstico a los laboratorios departamentales de salud. El INS utiliza pruebas serológicas elaboradas con antígenos crudos para diagnóstico de enfermedad de Chagas y leishmaniasis visceral, sin embargo, este tipo de pruebas son muy difíciles de transferir dado que se requiere el mantenimiento de los parásitos en cultivo. Lo anterior, sumado a que las dos enfermedades

se presentan en las mismas zonas geográficas y con manifestaciones clínicas similares evidencia la necesidad de pruebas de diagnóstico con elevada especificidad que permitan realizar diagnóstico diferencial y que puedan ser transferidas a otros laboratorios.

Adicionalmente, se desconocen varios aspectos respecto a la epidemiología molecular de estas parasitosis, y teniendo en cuenta que los dos parásitos comparten características como distribución geográfica, manifestaciones clínicas e infección en reservorios mamíferos, se requieren técnicas que permitan estudiar la dinámica de transmisión del parásito en los diferentes escenarios epidemiológicos de transmisión. Con este estudio se proporcionará información acerca de la distribución de las DTUs de *T. cruzi* y de especies de *Leishmania spp.*, en pacientes, vectores y reservorios y su relación con características clínicas y epidemiológicas de cada parasitosis respectivamente, con el fin de que dicha información sea de utilidad en la generación de herramientas para vigilancia y control de las leishmaniasis y la enfermedad de Chagas en Colombia.

En el caso de enfermedad de Chagas, hasta el momento en el país, el diagnóstico en vectores y reservorios se realiza principalmente mediante técnicas directas como el hemocultivo, que debido a su baja sensibilidad, ha limitado los análisis epidemiológicos de la enfermedad. En este proyecto, se implementarán las técnicas moleculares como herramientas complementarias para el diagnóstico de *T. cruzi* en todos los escenarios clínicos de la enfermedad y el circuito epidemiológico completo (humanos, vectores y reservorios), con el fin de fortalecer el diagnóstico a nivel nacional, la vigilancia y estudio de brotes agudos, el seguimiento post tratamiento y dar soporte a los programas de control vectorial.

En cuanto a los aportes en epidemiología molecular, en enfermedad de Chagas, es poca la información que se conoce acerca de la dinámica de transmisión del parásito en los brotes agudos de posible transmisión oral. Mediante este proyecto se realizará el primer estudio de genotipificación y análisis de marcadores moleculares de alta resolución (microsatélites) en muestras y aislamientos obtenidos de humanos, reservorios y triatomíneos involucrados en dos brotes de presunta transmisión oral, para proporcionar información acerca de la dispersión y dinámica de transmisión de *T. cruzi*, con el fin de obtener el conocimiento necesario para fortalecer estrategias de control y prevención en los escenarios de brotes agudos (73). Adicionalmente, se realizó análisis de preferencias alimenticias de triatomíneos silvestres lo que permitirá identificar focos de infección, factores de riesgo, y distribución de mamíferos en los ciclos de transmisión silvestres (222).

En las leishmaniasis, la principal dificultad consiste en la complejidad de las técnicas de identificación de especies, lo que ha impedido que se pueda obtener información acerca de la clasificación clínica de la enfermedad, la respuesta terapéutica, la severidad de la enfermedad y ha generado que no se brinde oportunamente el tratamiento a los pacientes.

El aporte de este estudio consistirá en el diseño de una técnica de HRM que permitirá la tipificación de 6 especies circulantes en Colombia, la cual es de gran utilidad ya que proporciona la especie involucrada tan solo 3 horas después de obtenido el ADN del parásito,

hecho que facilita sustancialmente el diagnóstico rápido y permite obtener la información necesaria para clasificar de la enfermedad y su respuesta al tratamiento, teniendo en cuenta que estas características difieren con respecto a la especie de *Leishmania* involucrada (10).

La falta de actualización de la distribución de especies de *Leishmania* en humanos, insectos vectores y mamíferos reservorios genera un grave vacío en el conocimiento dado que no permite el estudio de la dinámica de transmisión de la enfermedad y por ende no se puede usar esta información para el diseño de estrategias de vigilancia, control y prevención de esta parasitosis.

En este contexto, el desarrollo de este proyecto es de importancia para el país, dado que permite mediante el uso de técnicas moleculares, fortalecer aspectos que requieren atención en enfermedad de Chagas y las leishmaniasis. En primera instancia en el diagnóstico, que es el aspecto clave para la identificación oportuna de los casos y en segunda una aproximación a la epidemiología molecular de estas parasitosis en Colombia que proporcionará herramientas que ayudan a fortalecer el conocimiento acerca de la dinámica de transmisión y de los determinantes genéticos del parásito que pueda estar relacionados con las características fenotípicas y epidemiológicas de estas enfermedades.

Finalmente, con los resultados de esta investigación, se pretende contribuir a las metas planteadas en el plan decenal de salud pública. Debido a que el estudio será realizado en el INS, las técnicas moleculares desarrolladas en este proyecto, podrán ser difundidas a los laboratorios departamentales de salud pública mejorando la capacidad diagnóstica en el nivel central y regional. Adicionalmente, algunos de los resultados obtenidos serán difundidos en revistas indexadas, eventos académicos y reuniones de autoridades nacionales y departamentales de salud. De esta manera, el proyecto contribuirá herramientas cuyo uso permitirá el cumplimiento de la meta de reducir en un 30% la letalidad por Enfermedad de Chagas aguda en las entidades territoriales del país y la reducción progresiva y sostenida del número de casos de leishmaniasis.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar técnicas moleculares para detección y tipificación de *T. cruzi* y *Leishmania spp* en Colombia, con el fin de evaluar su utilidad para diagnóstico y epidemiología molecular en Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis cutánea.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1** Aplicar PCR convencional y qPCR para detección de *T. cruzi* en muestras obtenidas de pacientes de todas las fases clínicas, pre-post tratamiento etiológico y vectores.
- 4.2.2** Determinar las DTUs de *T. cruzi* y analizar su distribución en diferentes escenarios clínicos y epidemiológicos de la enfermedad de Chagas.
- 4.2.3** Analizar la dispersión y dinámica de transmisión de *T. cruzi* en brotes de presunta transmisión oral, mediante genotipificación y aplicación de marcadores moleculares de alta resolución (Microsátelites) en muestras del circuito epidemiológico completo involucrado.
- 4.2.4** Diseñar un ensayo de High-Resolution Melting (HRM) para discriminar las especies de *Leishmania* en Colombia e implementarlo en aislamientos obtenidos de reservorios, vectores y humanos.
- 4.2.5** Analizar la distribución de especies de *Leishmania* asociadas a leishmaniasis cutánea en Colombia mediante secuenciación del gen *citocromo b*, en aislamientos obtenidos de humanos, reservorios y vectores

5 METODOLOGIA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *T. cruzi*

5.1.1 Diagnóstico y epidemiología molecular de *T. cruzi* en fases clínicas de enfermedad de Chagas

5.1.1.1 Metodología

- Población de estudio

La población inicial de estudio fue de 985 pacientes quienes solicitaron diagnóstico y/o tratamiento etiológico para enfermedad de Chagas en el laboratorio de Parasitología del (INS), en el periodo comprendido entre los años 2004 a 2015.

Los criterios de inclusión fueron: 1. Presentar sospecha clínica o epidemiológica de enfermedad de Chagas en fase aguda o crónica 2. No haber recibido tratamiento etiológico para enfermedad de Chagas 3. Pruebas serológicas positivas para enfermedad de Chagas (IFI, ELISA y/o HAI) 4. Muestra adecuada de suero o sangre para realizar pruebas de diagnóstico según la fase. Adicionalmente, con el fin de recolectar pacientes negativos se incluyeron pacientes que asistieron para atención de parasitosis diferentes a Enfermedad de Chagas.

El estudio se realizó de manera retrospectiva en los pacientes incluidos entre los años 2004 a 2012, en los que se revisó la disponibilidad de la historia clínica, los resultados de pruebas de laboratorio previas al tratamiento y de muestras necesarias para las pruebas moleculares. En los pacientes reclutados durante el periodo de 2013 a 2015, el estudio se realizó de manera prospectiva. Los pacientes incluidos fueron diagnosticados y clasificados en las diferentes fases clínicas de la enfermedad de Chagas mediante análisis de sus síntomas y aplicación de pruebas parasitológicas y serológicas (3,81).

El cálculo de la muestra N se realizó por separado para cada fase clínica. Considerando $n = \frac{Z^2 S(1-S)}{d^2}$, donde S es un valor predeterminado de sensibilidad que se determina mediante los datos publicados anteriormente (5,8,9,12,95), con un nivel de confianza del 95% ($1 - \alpha$, con $\alpha = 0,05$) el valor de Z es 1.96, y d que es el error máximo marginal de estimación y es elegido por los investigadores juicio (223). Entonces, $N = n / P$, siendo P la prevalencia estimada para las dos fases que se indicó al 60% en los casos sospechosos. Basado en estudios anteriores, para la fase aguda S fue pre-establecido en 92% y un valor d de 8% (9,12), mientras que para la fase crónica el valor de S fue pre-establecido al 60% con un valor d de 5% (5,8,9,12,95). Los tamaños mínimos de la muestra total (pacientes positivos y negativos) se calcularon como $N = 74$ y $N = 615$ para las fases aguda y crónica, respectivamente.

Los pacientes fueron diagnosticados en fase aguda, cuando presentaron síntomas compatibles con esta fase, nexo epidemiológico y positividad en pruebas parasitológicas: Strout, microstrout, gota gruesa, hemocultivo y/o en dos pruebas serológicas IFI, ELISA y HAI (72,224). Los pacientes en fase crónica fueron diagnosticados mediante la positividad de dos pruebas serológicas de diferente principio (ELISA, IFI y HAI) y posteriormente fueron clasificados en indeterminados y cardiacos, de acuerdo a la ausencia o presencia de síntomas, respectivamente.

A todos los pacientes se les aplicó una encuesta cuya finalidad fue conocer los posibles factores de riesgo a los que se encontraban expuestos, tales como el lugar de nacimiento, conocimiento de insectos vectores, haber recibido donaciones de sangre y/o órganos, tipo de vivienda, sintomatología cardíaca. Los pacientes cuyas pruebas serológicas fueron negativas se clasificaron en dos grupos de acuerdo a la presencia o ausencia de factores de riesgo, tales como el hecho de haber nacido o vivido en zonas endémicas, el reconocimiento de insectos vectores, haber recibido donaciones de sangre u órganos o pruebas de tamizaje positivas. Los pacientes que presentaran algún factor de riesgo, fueron denominados “negativos con factor de riesgo”, los que no tuvieran ningún factor de riesgo fueron denominados “negativos sin factor de riesgo”.

- **Pruebas de diagnóstico**

Las pruebas estándar de oro para enfermedad de Chagas se clasifican de acuerdo a la fase clínica. En fase aguda el estándar de oro es la observación del parásito por métodos parasitológicos directos y/o la serología, sumado a la presencia de sintomatología clínica compatible. En fase crónica, la presencia de anticuerpos IgG evidenciada mediante dos pruebas serológicas de diferente fundamento se considera el estándar de oro (59,81). Las pruebas moleculares se han propuesto como herramientas complementarias al diagnóstico, dado que la detección de ADN se puede lograr durante todas las fases de la enfermedad, son de utilidad en pacientes inmunosuprimidos y para seguimiento terapéutico. En este estudio se determinaron las capacidades operativas (Sensibilidad, Especificidad, Valores predictivos y Razones de verosimilitud) e índices Kappa de las pruebas moleculares con respecto al estándar de oro en cada una de las fases clínicas e la enfermedad. A continuación, se detallan las capacidades operativas calculadas:

- *Sensibilidad:* La sensibilidad de una prueba es la probabilidad de que un paciente enfermo de resultado positivo o es el porcentaje de positivos de la prueba en pacientes con la enfermedad:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos} \times 100}{\text{Total de pacientes enfermos}}$$

- *Especificidad:* Es la probabilidad de que un paciente sano de resultado negativo en la prueba negativa o el porcentaje de negatividad de la prueba diagnóstica en ausencia de enfermedad.

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos} \times 100}{\text{Total de pacientes sanos}}$$

- *Valor predictivo positivo (VPP)*: es el porcentaje de pacientes enfermos entre todos los pacientes con resultados positivos. Valora la probabilidad de que una prueba positiva correspondiese a un verdadero enfermo.

$$\text{VPP} = \frac{\text{Verdaderos positivos} \times 100}{\text{Total positivos (verdaderos positivos + falsos positivos)}}$$

- *Valor predictivo negativo (VPN)*: es el porcentaje de individuos sanos con resultados negativos con relación al total de resultados negativos. Valora la probabilidad de que una prueba negativa diagnostique correctamente a un individuo sano

$$\text{VPN} = \frac{\text{Verdaderos negativos} \times 100}{\text{Total negativos (verdaderos negativos + falsos negativos)}}$$

- *Razón de verosimilitud positivo (LR+)*: También se conoce como proporción de probabilidad para un resultado positivo, e indica cuánto aumentan las probabilidades de la enfermedad cuando un resultado es positivo.

$$\text{LR} + = \frac{\text{Verdaderos positivos} / (\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos})}{\text{Falsos positivos} / (\text{falsos positivos} + \text{verdaderos negativos})}$$

- *Razón de verosimilitud negativo (LR-)*: También se conoce como la proporción de probabilidad para un resultado negativo e indica cuánto disminuyen las probabilidades de la enfermedad cuando un resultado es negativo.

$$\text{LR} - = \frac{\text{Falsos negativos} / (\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos})}{\text{Negativos verdaderos} / (\text{falsos negativos} + \text{negativos verdaderos})}$$

- **Métodos parasitológicos**

Los métodos parasitológicos directos utilizados fueron strout, microstrout, gota gruesa y hemocultivo según lo descrito previamente por Freilij et al., 1983 (31).

- **Pruebas serológicas**

Las pruebas serológicas convencionales utilizadas fueron ELISA, IFI y HAI las cuales fueron estandarizadas en el Laboratorio de Parasitología del INS utilizando antígeno total de cepas de *T. cruzi* colombianas cuya DTU es TcI. Las pruebas serológicas fueron realizadas por duplicado y se utilizaron controles positivos y negativos en cada montaje. Las muestras

fueron consideradas positivas para el caso de ELISA cuando la absorbancia fue ≥ 0.300 , en la IFI títulos $\geq 1/32$ y en la HAI títulos $\geq 1/32$ (224).

- **Pruebas moleculares**

Se aplicaron PCR convencional y qPCR Multiplex para detección de ADN de *T. cruzi*, las muestras fueron analizadas en ciego, sin conocer previamente los resultados de serología. Los procedimientos fueron realizados siguiendo los parámetros establecidos por Clinical & Laboratory Standards Institute (225).

Se recolectaron muestras de 10mL de sangre total en EDTA, inmediatamente se agregó igual volumen de clorhidrato de guanidina 6M y se refrigeraron (2-8°C) hasta su procesamiento, el cual fue realizado posterior a 48 horas de la recolección. Con el fin de evitar contaminación el clorhidrato de guanidina fue preparado previamente en la zona de pre-mezcla y allí se sirvieron alícuotas de 10 mL en tubos falcón, las cuales fueron mezcladas con la sangre en el sitio de toma de muestras, esto con el fin de evitar contaminación previa del clorhidrato. La recolección de suero se realizó mediante separación por centrifugación de sangre total en tubo seco, durante 10 minutos a 3000 rpm, los sueros obtenidos fueron congelados (-20°C) hasta su procesamiento.

• **Extracción de ADN**

Previo a la extracción de ADN, se añadieron 5µL del plásmido IAC (concentración 40 pg/µL) a 300 µL de muestra de sangre en guanidina 6M. Se realizó extracción de ADN de las muestras de sangre mediante el Kit High Pure PCR Template Roche® según lo descrito por Duffy et al., 2013 (9). Adicionalmente, se realizó extracción de ADN de muestras de suero realizando una modificación al protocolo descrito para sangre, la elución se realizó en 50 µL del buffer de elución (226). Para evitar contaminación se extrajo un máximo de 12 muestras por montaje, en cada procedimiento se incluyó un control negativo (Sangre total en guanidina de un paciente seronegativo sin factores de riesgo) y un control de reactivos (Agua).

• **PCR convencional**

Se realizó PCR convencional (cPCR) para detección de ADN nuclear satélite de *T. cruzi* y para detección de ADN quinetoplasto de *T. cruzi* según lo descrito por Ramírez et al., 2009 (5). La PCRst se aplicó a todas las muestras utilizando los primers cruzi 1 y cruzi 2, mientras que la PCRk, se utilizó únicamente en las muestras positivas para diferenciar *T. cruzi* y *T. rangeli* utilizando los primers 121-122 (Tabla 1) (94).

• **PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR) multiplex utilizando sondas TaqMan para amplificación y cuantificación de ADN satélite de *T. cruzi* y ADN de control de amplificación interno.**

Mediante esta técnica se realizó la detección y cuantificación del ADN satélite de *T. cruzi* y ADN del plásmido IAC (control de amplificación interno) en muestras de sangre y suero de humanos y reservorios. Para la detección de ADN satélite se utilizaron los iniciadores cruzi 1 y cruzi 2 y la sonda cruzi 3 (Tabla 1). Las condiciones de reacción, son las descritas por Duffy et al., 2013(9). La cuantificación se llevó a cabo mediante una curva estándar, que consiste en realizar diluciones seriadas del ADN que abarcan desde menos de 1 equivalente parásito/mL hasta 10.000 equivalentes parásitos/ml utilizando la cepa MHOM/CO/01/DA cuya DTU es TcI, esto debido a que varios estudios han recomendado el uso de la DTU de mayor circulación en la zona estudiada, varios estudios demuestran que TcI es la de principal circulación en Colombia (47,48,227–229).

El control interno de amplificación fue un plásmido recombinante lineal (IAC) cuyo inserto es una secuencia de ADN que codifica para la proteína Tip5:1 de *Arabidopsis thaliana*, una acuaporina específica del polen que no tiene semejanza con ninguna proteína de mamíferos, insectos o Trypanosomátidos. El plásmido IAC, se agregó a las muestras de sangre previa a la extracción de ADN y se utilizó para normalizar el valor crudo de la carga parasitaria, según el rendimiento de la extracción de ADN de la muestra sanguínea y la eficiencia de amplificación (9). La amplificación se realizó en el termociclador 7500 Fast Applied Biosystems, los análisis de resultados y cálculo de las parasitemias se realizaron mediante el software 7500 software v2.0.6.

Tabla 1. Secuencias de sondas e iniciadores usados para detección y cuantificación de ADN de *T. cruzi* mediante qPCR, PCRst y PCRk.

Iniciadores	Secuencia	
Cruzi 1 (Forward)	ASTCGGCTGATCGTTTTTC	Amplicón 166 pb
Cruzi 2 (Reverse)	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	
Cruzi 3 (Sonda)	FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB	
IACRv	CTCCCGCAACAAACCCTATAAAT	Amplicón 110 pb
IACFw	ACCGTCATGGAACAGCACGTA	
IACq	VIC-AGCATCTGTTCTTGAAGGT-NFQ-MGB	
121	AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA	<i>T. cruzi</i> : 330 pb
122	GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA	<i>T. rangeli</i> : 400-450 pb

- **Controles**

Los controles negativos y positivos fueron corridos en cada montaje realizado de las técnicas de qPCR y cPCR para diagnóstico molecular de *T. cruzi*. Se describen a continuación.

- **Controles negativos:** Se usaron como controles negativos, ADN obtenido de muestras de sangre del grupo de pacientes negativos sin factores de riesgo. Como control de reactivos se añadió a la mezcla agua en lugar de ADN.
- **Controles positivos:** Se utilizó como controles positivos: ADN extraído de muestras de sangre de pacientes confirmados por métodos directos (Hemocultivo o gota gruesa).
- **Controles para la técnica de PCRk:** Se utilizó como controles ADN obtenido de cepas de *T. cruzi* (MHOM/CO/01/DA) y de *T. rangeli* (IRHO/CO/82/Choachi).

- **Análisis de resultados**

El umbral para definir la positividad de las muestras fue 0.01. Se consideraron como positivas aquellas muestras que superaban este umbral con amplificación exponencial evidente y como negativas aquellas que no superaron el umbral.

- **Técnicas de genotipificación**

Los métodos de genotipificación permiten la discriminación de DTUs. En las muestras con diagnóstico molecular positivo para *T. cruzi*, se aplicaron técnicas de PCR para amplificar 5 marcadores moleculares: dos regiones del espaciador intergénico del gen mini-exón (SL-IR), ADN ribosomal 24S α , ADN ribosomal 18S y el fragmento A10, ampliamente utilizados para la discriminación de *T. cruzi* en sus seis DTUs y a su vez clasificar TcI en los genotipos TcI-Doméstico y TcI-Selvático, basándose en los tamaños de amplicones obtenidos (Figura 7) (48,111,119,228).

Como controles positivos se utilizaron 7 cepas: MHOM/CO/01/DA (TcI-Doméstico), MHOM/CO/10/GC (TcI-Selvático), TcII (CepaY), TcIII (Cepa CM17), TcIV (Cepa YLY), TcV (Cepa Tulahuen), TcVI (Cepa CL-Brener) genotipificadas previamente mediante varios marcadores moleculares y secuenciación.

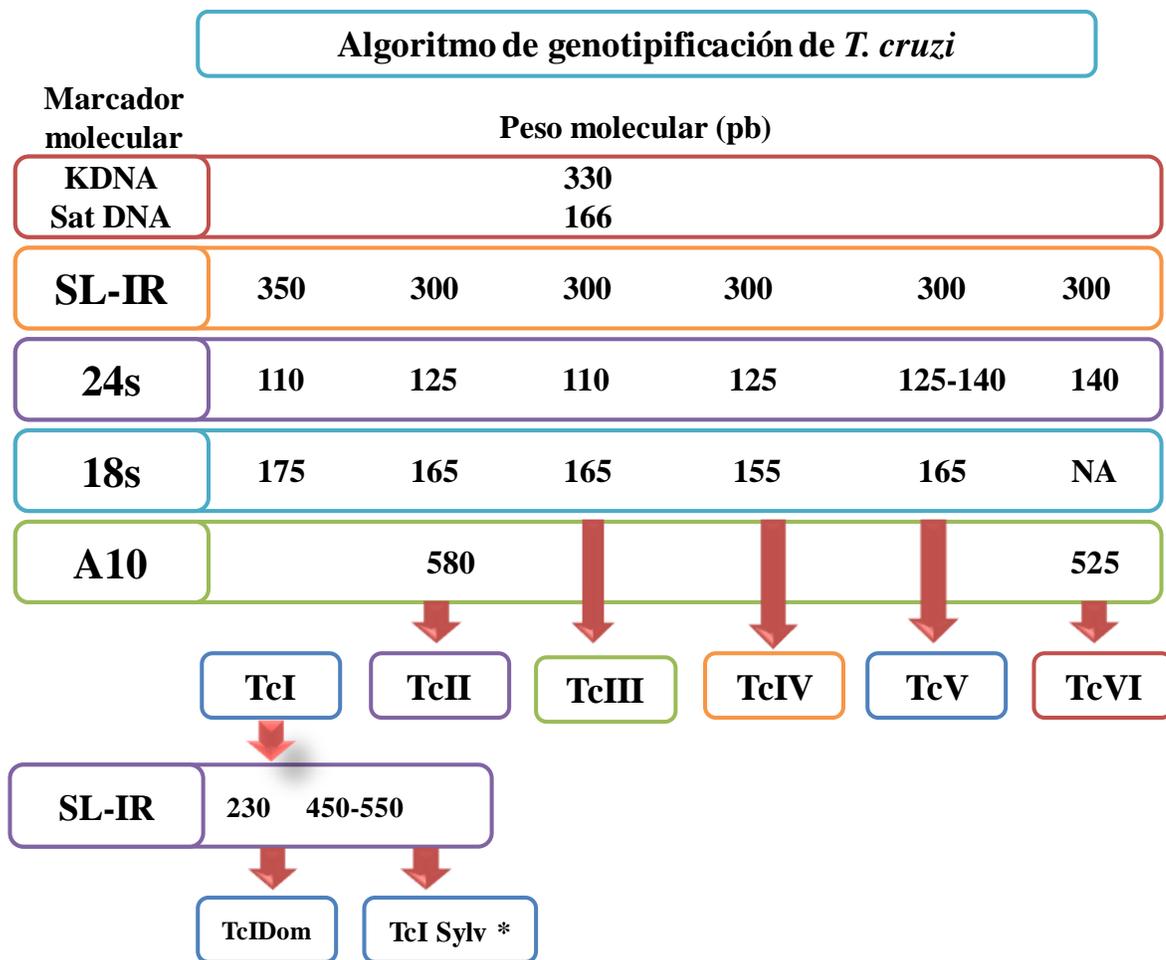


Figura 7. Algoritmo de genotipificación de *T. cruzi*. Se muestran los tamaños de fragmentos de amplificación obtenidos mediante PCR de 5 marcadores moleculares: dos regiones del espaciador intergénico del gen mini-exón (SL-IR), DNA ribosomal 24S α , DNA ribosomal 18S y el fragmento A10, para discriminación de *T. cruzi* en sus seis DTUs y a su vez clasificar la DTU TcI en los genotipos TcI-Doméstico y TcI-Selvático.

- Análisis estadísticos:

Los datos fueron tabulados en Ms Excel y se analizaron mediante el software STATA 12.0. Se calcularon las capacidades operativas de las pruebas moleculares (sensibilidad (Se), especificidad (Es) y razón de verosimilitud (LR), valores predictivos (PV), precisión diagnóstica (DA) y área bajo la curva (AUROC)) e índice Kappa (κ), en tres categorías según la fase clínica: (pacientes agudos, crónicos indeterminados y crónicos cardíacos), según las DTUs y genotipos de TcI encontradas en los pacientes analizados (TcI (TcI-Selvático/TcI-Doméstico), TcII, TcIII y TcV) y según grupos de edad (cuartiles).

Se utilizó el análisis de Shapiro Wilk para analizar la distribución de los datos analizados. Se calcularon las medianas de las parasitemias en cada una de las fases clínicas y según las DTUs y genotipos de TcI. Se utilizó el test de Mann-Whitney para comparación de medianas de parasitemias y se consideró un valor de $p < 0.05$ estadísticamente significativo. Se calcularon las frecuencias de las DTUs y genotipos de TcI en cada una de las fases clínicas y se realizó comparación de proporciones mediante análisis de dos proporciones de muestras.

5.1.1.2 Resultados

- **Cargas parasitarias de *T. cruzi* en muestras de sangre de pacientes en diferentes fases de la enfermedad de Chagas.**

Se incluyeron 708 pacientes, diagnosticados en el INS, en el periodo comprendido entre 2004 y 2015 (Figura 8). Las características generales de los pacientes se presentan en la (Tabla 2).

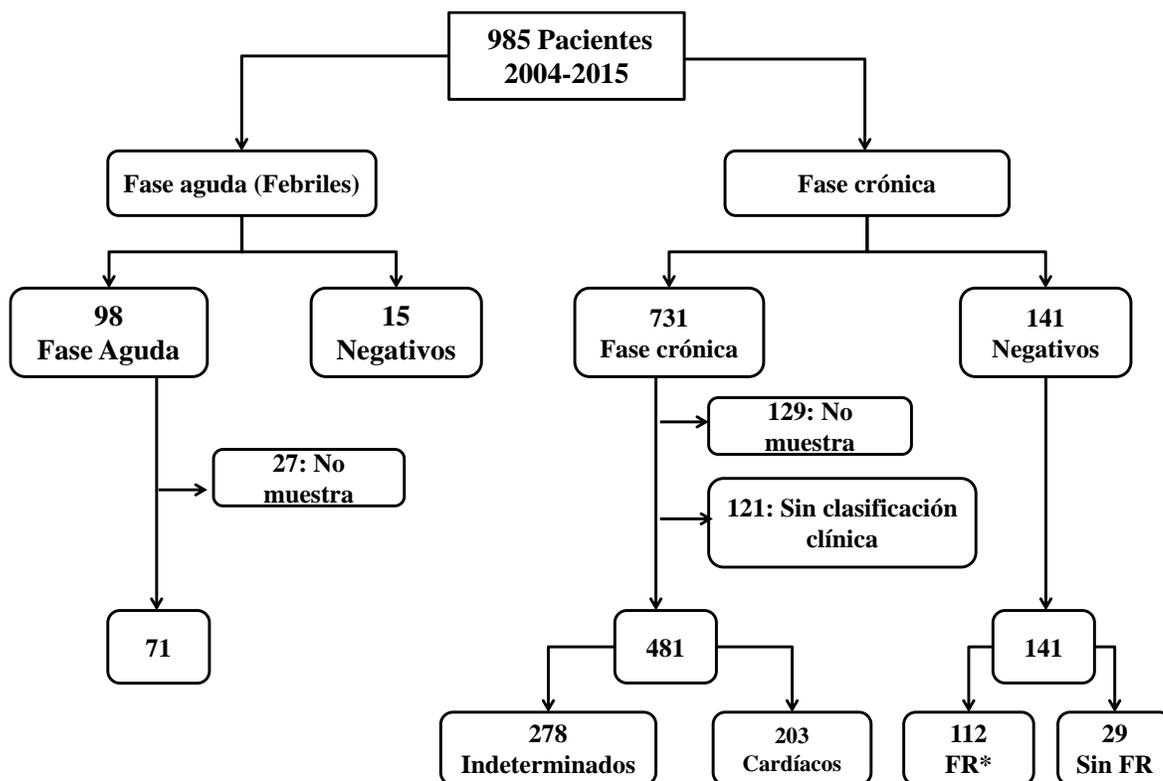


Figura 8. Algoritmo de selección de pacientes. Durante el curso del estudio fueron diagnosticados en el INS, 98 pacientes con Chagas agudo, de los cuales fueron excluidos 27 debido a que no contaban con muestra de sangre en guanidina o suero disponible en INS para realizar pruebas moleculares, quedando finalmente 71 pacientes positivos que sumados a 15 pacientes febriles negativos totalizan 86 pacientes para diagnóstico en fase aguda. En cuanto a los pacientes crónicos, fueron atendidos 731 de los que se excluyeron 121 por no contar con

la información clínica necesaria para su clasificación clínica y 129 fueron descartados por no contar con muestras de sangre en guanidina o suero previas a la administración del tratamiento etiológico, quedando 481 pacientes que sumados a los 141 pacientes negativos totalizaron 622 para diagnóstico de fase crónica. FR: Factores de riesgo.

Las pruebas moleculares fueron aplicadas durante el periodo comprendido entre 2011 a 2015, de tal forma que los pacientes incluidos durante este periodo se les realizaron las pruebas moleculares y serológicas simultáneamente. En los pacientes incluidos entre 2004 y 2011 se realizaron las pruebas serológicas en el momento de la inclusión y posteriormente, en aquellos pacientes en los que hubo disponibilidad de muestras de suero, se realizaron pruebas moleculares y la repetición de pruebas serológicas en el periodo comprendido entre 2011 y 2015.

Tabla 2. Características generales de los pacientes incluidos en el estudio.

Características Generales		Fase aguda N=86		Fase crónica N=622	
		Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Número de Pacientes	708	71	15	481	141
Edad (Q1-Q3) *	48 (47-49)	31 (26-35)	27 (23-30)	51 (50-53)	37 (39-41)
Sexo, n (%)					
Femenino	428 (60.4)	26 (36.6)	8 (53.3)	313 (65.1)	60 (42.5)
Masculino	280 (39.6)	45 (63.4)	7 (46.7)	168 (34.9)	81 (52.4)

*Edad en años

Durante la fase aguda la prueba de qPCR fue positiva en el 95.7% de los pacientes y la cPCR en el 88.5%. Durante la fase crónica indeterminada la qPCR fue positiva en el 68.0% de los casos y la cPCR en 55.4%, en la fase crónica cardiaca la positividad de la qPCR fue del 59.1% y la cPCR en el 58.6%. En todos los casos positivos la PCRk fue positiva para *T. cruzi*. En los pacientes negativos con factor de riesgo la qPCR y cPCR fueron positivas en 3.6% de las muestras. En los pacientes cuyo resultado de qPCR fue positivo se detectaron las cargas parasitarias. Las medianas de parasitemias encontradas en los diferentes pacientes según la fase clínica se describen en la Tabla 3 de acuerdo a las fases clínicas.

Tabla 3. Medianas de parasitemias de pacientes con enfermedad de Chagas según las fases clínicas

Fase clínica	Cargas parasitarias (Equivalentes parásitos/mL)		
	Mediana	Q1	Q3
<i>Fase aguda</i>	4.69	3.29	7.27
<i>Fase crónica</i>	1.33	1.18	1.64

Fase indeterminada	1.67	1.33	1.93
Fase cardíaca	1.08	0.91	1.32
<i>Negativos</i>	0.00	0.00	0.00
Febriles negativos	0.00	0.00	0.00
Negativos con FR	0.00*	0.00	0.00
Negativos sin FR	0.00	0.00	0.00
Total	2.95	2.51	3.71

FR: Factores de riesgo. **Q1-Q3:** p25-p75* El promedio de las 4 muestras positivas fue 0.81 equivalentes parásitos/mL

En cuanto a las comparaciones de cargas parasitarias, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes en fase aguda con respecto a los pacientes en fase crónica ($p=0.000$) y a su vez con respecto los pacientes en fase crónica indeterminada ($p=0.000$) y en fase crónica cardíaca ($p=0.000$). Adicionalmente, también fue estadísticamente significativa la diferencia entre pacientes crónicos indeterminados y cardíacos ($p=0.0235$). La distribución de las cargas parasitarias según las fases clínicas se puede observar en la **Figura 9**.

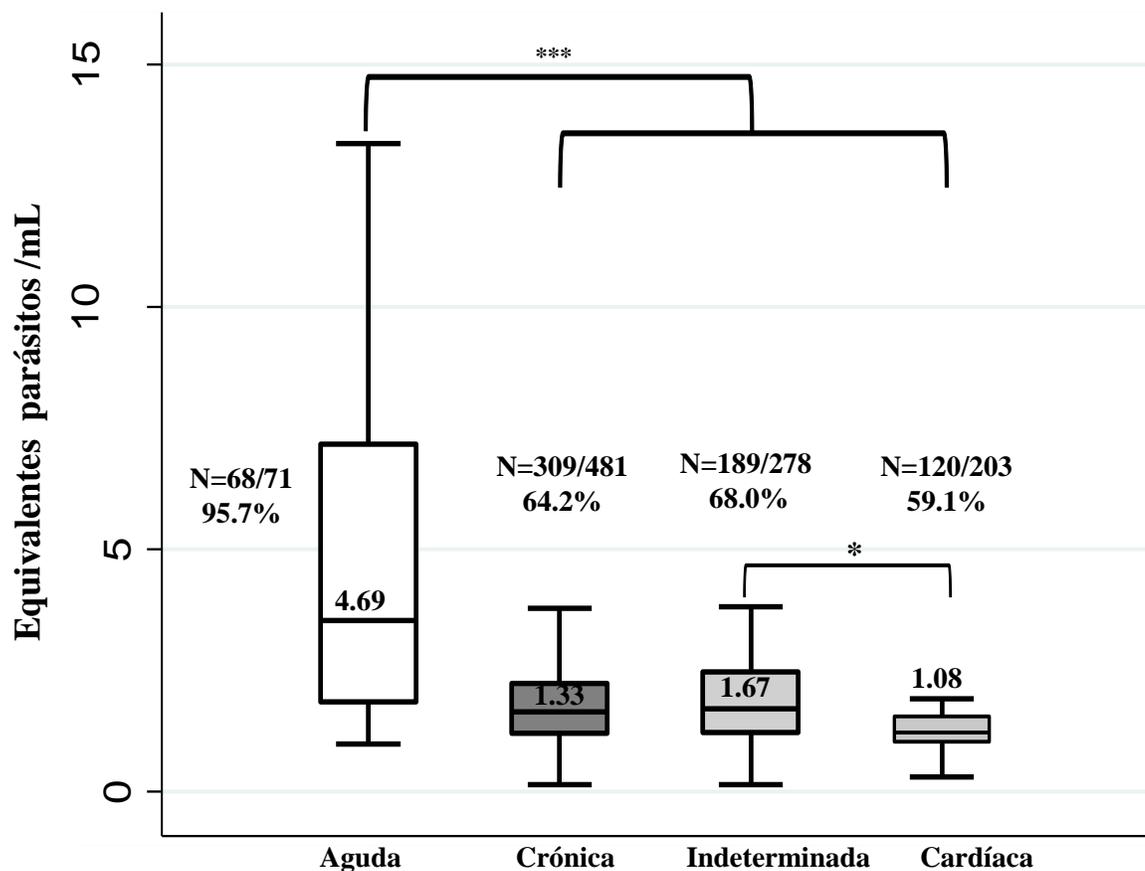


Figura 9. Distribución de cargas parasitarias en pacientes con enfermedad de Chagas en diferentes fases clínicas. Positividad de qPCR y medianas de cargas parasitarias en cada una de las fases clínicas de enfermedad de Chagas. * p= <0.05, *** p=<0.001

- Capacidades operativas de técnicas moleculares para diagnóstico de enfermedad de Chagas.

Las capacidades operativas encontradas en las diferentes fases clínicas se evidencian en las Tablas 4 y 5. El AUROC, durante la fase aguda para qPCR fue de 0.9786 y para cPCR de 0.9072 y en fase crónica fue de 0.8212 para qPCR y 0.7838 para cPCR. En la fase crónica indeterminada el AUROC para qPCR fue de 0.8399 y para la cPCR de 0.7770; y en fase crónica cardiaca el AUROC para la qPCR fue de 0.7956 y para la cPCR de 0.7931 (Figuras 10 y 11).

Tabla 4. Capacidades operativas de pruebas moleculares en fase aguda y crónica de enfermedad de Chagas

<i>Capacidades Operativas</i>	<i>Fase aguda n= 70</i>		<i>Fase crónica n=511</i>	
	<i>qPCR (IC:95%)</i>	<i>cPCR (IC:95%)</i>	<i>qPCR (IC:95%)</i>	<i>cPCR (IC:95%)</i>
<i>Sensibilidad</i>	95.7 (88.1-98.5)	84.3 (74.0-91.0)	64.2 (59.9-58.4)	56.8 (52.3-61.1)
<i>Especificidad</i>	100.0 (88.3-100.0)	100.0(88.3.8-100.0)	100.0 (88.3-100.0)	100 (88.3-100.0)
<i>VPP</i>	100.0 (94.6-100.0)	100.0 (93.9-100.0)	100.0 (98.8-100.0)	100.0 (98.6-100.0)
<i>VPN</i>	90.6 (75.8-96.8)	72.5 (57.2-83.9)	14.4 (10.2-19.9)	12.2 (8.7-17.0)
<i>Precisión</i>	96.9 (91.5-98.9)	88.9 (81.9-93.7)	66.3(62.1-70.2)	59.2 (54.9-63.4)
<i>LR+</i>	-	-	-	-
<i>LR-</i>	0.04 (0.02-0.08)	0.16 (0.13-0.19)	0.36 (0.35-0.36)	0.43 (0.42-0.44)
<i>K</i>	0.92 (0.73 - 1.12)	0.75 (0.56-0.94)	0.17 (0.12-0.21)	0.13 (0.08-0.17)

VPP: Valor predictivo positivo, **VPN:** Valor predictivo negativo, **LR:** Razón de verosimilitud, **K:** Índice Kappa

Tabla 5. Capacidades operativas de pruebas moleculares en fase crónica de enfermedad de Chagas

<i>Capacidades Operativas</i>	<i>Fase crónica indeterminada n=278</i>		<i>Fase crónica cardiaca n=203</i>	
	<i>cPCR (IC:95%)</i>	<i>qPCR (IC:95%)</i>	<i>cPCR (IC:95%)</i>	<i>qPCR (IC:95%)</i>
<i>Sensibilidad</i>	55.4 (49.5-61.1)	68.0 (62.3-73.2)	58.6 (51.8-65.2)	59.1 (52.2-65.7)
<i>Especificidad</i>	100.0 (88.3-100.0)	100 (88.3-100)	100.0 (88.3-100.0)	100 (88.3-100)

VPP	100.0 (97.6-100.0)	100 (98.0-100)	100.0 (96.8-100.0)	100 (96.9-100)
VPN	18.9 (13.5-25.9)	24.6 (17.7-37.1)	25.6 (18.5-34.4)	25.9 (18.7-34.7)
Precisión	59.6 (54.0-64.9)	71.0 (65.7-75.8)	63.6 (57.2-69.6)	64.2 (57.9-70.1)
LR+	-	-	-	-
LR-	0.44 (0.43-0.45)	0.32 (0.31-0.33)	0.41 (0.40-0.43)	0.41 (0.39-0.41)
K	0.19(0.12-0.25)	0.29 (0.21-0.36)	0.26 (0.17-0.34)	0.26(0.17-0.35)

VPP: Valor predictivo positivo, **VPN:** Valor predictivo negativo, **LR:** Razón de verosimilitud **K:** Índice Kappa

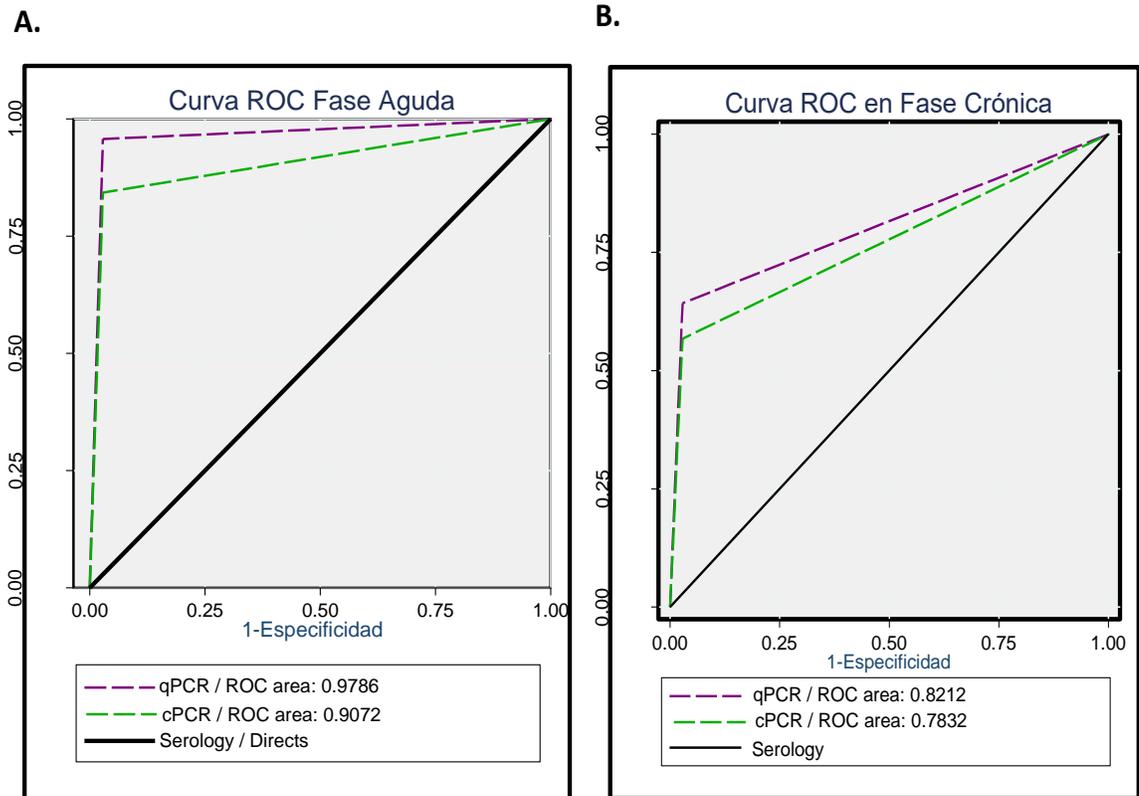


Figura 10. Curvas ROC de pruebas moleculares en fase aguda y crónica de enfermedad de Chagas. Áreas bajo la curva para las fases aguda y crónica.

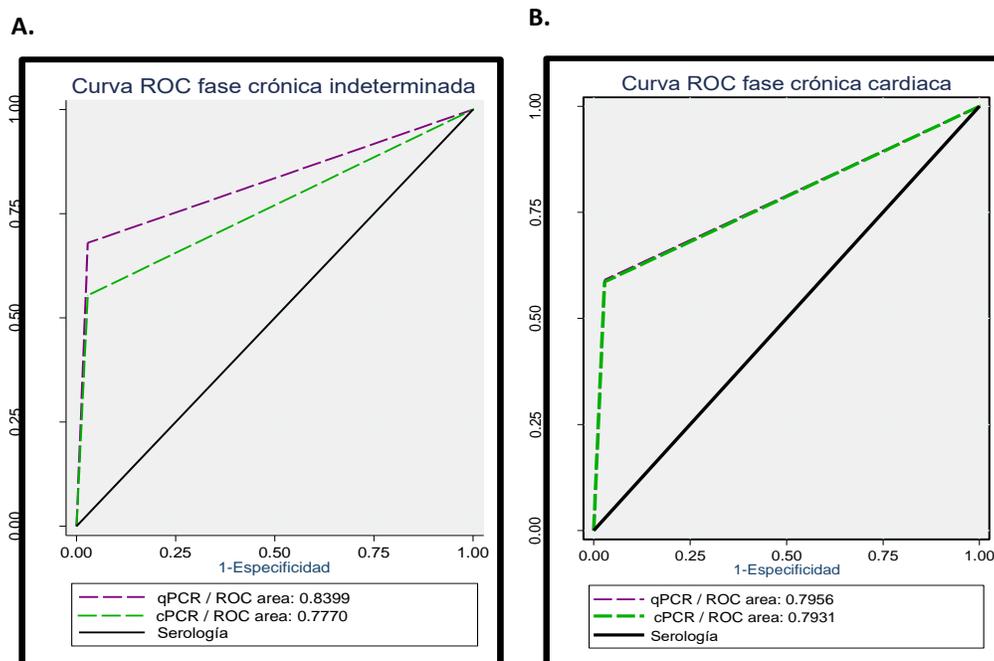


Figura 11. Curvas ROC de pruebas moleculares en fases crónica indeterminada y crónica cardiaca de enfermedad de Chagas. Áreas bajo la curva para las fases crónica indeterminada y cardíaca. cPCR: PCR convencional. qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real.

Finalmente, los pacientes fueron clasificados en cuatro grupos de edad de acuerdo a los cuartiles de la edad y se determinaron las capacidades operativas y parasitemias en cada uno de los grupos. Se encontraron diferencias en las capacidades operativas, más no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las medianas de parasitemias en cada grupo (Tabla 6 y Tabla 7).

Tabla 6. Medianas de cargas parasitarias de pacientes con enfermedad de Chagas según grupos de edad

Grupos	Edad (años)	n =669	Mediana	Q1-Q3
Grupo 1	2 a 36	167	3.01	2.45-4.59
Grupo 2	37 a 49	196	2.83	2.24 -3.70
Grupo 3	49 a 59	150	3.07	2.11-4.27
Grupo 4	60 a 88	156	2.85	1.88-4.49

Q1-Q3: Cuartiles 25%-75%.

Tabla 7. Capacidades operativas de las técnicas moleculares en los diferentes grupos de edad

<i>Capacidades operativas</i>	Grupo 1: 2-36 años		Grupo 2: 37-49 años	
	<i>qPCR</i> (IC: 95%)	<i>cPCR</i> (IC: 95%)	<i>qPCR</i> (IC: 95%)	<i>cPCR</i> (IC: 95%)
<i>Sensibilidad</i>	83.84% (76.25-90.21)	69.9% (60.46-77.91)	70.93% (63.75-77.2)	59.88% (52.42. 66.92)
<i>Especificidad</i>	91.18% (82.0-95.8)	98.44% (91.67-99.72)	95.83% (79.76-99.26)	100% (86.2. 100.0)
<i>VPP</i>	93.26% (86.06-96.87)	98.63% (92.64-99.76)	99.19% (95.54-99.86)	100% (96.4. 100.0)
<i>VPN</i>	79.49% (69.25-86.96)	67.02% (57.01-75.69)	31.51% (22.0-42.86)	25.81% (18. 35.53)
<i>Precisión</i>	86.83% (83.61-93.07)	80.84% (74.2-86.09)	73.98% (67.42-79.62)	64.8% (57.88. 71.14)
<i>LR+</i>	9.50 (6.82-13.23)	44.74 (6.228-321.4)	17.02 (2.382-121.7)	-
<i>LR-</i>	0.17 (0.1563-0.201)	0.3057 (0.2869-0.3259)	0.3033 (0.2906-0.3166)	0.4012 (0.3899 - 0.4127)
<i>K</i>	0.733 (0.5827-0.8838)	0.6277 (0.4856-0.7698)	0.3554 (0.2455-0.4654)	0.2677 (0.1724 - 0.363)

<i>Capacidades operativas</i>	Grupo 3: 49-59 años		Grupo 4: 60-88 años	
	<i>qPCR</i> (IC: 95%)	<i>cPCR</i> (IC: 95%)	<i>qPCR</i> (IC: 95%)	<i>cPCR</i> (IC: 95%)
<i>Sensibilidad</i>	61.36% (52.85. 69.24)	56.3% (47.87. 64.37)	58.39% (50.02. 66.31)	54.01% (45.67. 62.14)
<i>Especificidad</i>	94.44% (74.24. 99.01)	94.44% (74.24. 99.01)	100% (83.18. 100.0)	100% (83.18. 100.0)
<i>VPP</i>	98.78% (93.41. 99.78)	98.7% (93. 99.77)	100% (95.42. 100.0)	100% (95.06. 100.0)
<i>VPN</i>	25% (16.23. 36.44)	22.37% (14.46. 32.93)	25% (16.63. 35.78)	23.17% (15.37. 33.38)
<i>Precisión</i>	65.33% (57.42. 72.48)	60.78% (52.87. 68.17)	63.46% (55.67. 70.61)	59.62% (51.77. 66.99)
<i>LR+</i>	11.05 (1.532 - 79.62)	10.13 (1.399 - 73.39)	-	-
<i>LR-</i>	0.4091 (0.391 - 0.428)	0.4627 (0.4446 - 0.4816)	0.4161 (0.402 - 0.4306)	0.4599 (0.4458 - 0.4744)
<i>K</i>	0.2537 (0.1423 - 0.3652)	0.2117 (0.1091 - 0.3144)	0.2548 (0.1501 - 0.3594)	0.2225 (0.1238 - 0.3212)

VPP: Valor predictivo positivo, **VPN:** Valor predictivo negativo, **LR:** Razón de verosimilitud **K:** Índice Kappa

- **Distribución de DTUs en pacientes en diferentes fases de la enfermedad de Chagas**

Se encontró que en el total de pacientes positivos (n=406), 74.1% (n=301) corresponde a TcI, 17.2% (n=70) a TcII, 1.48% (n=6) a TcIII, 0.5% (n=2) a TcV y 6.7 % (n=27) a infecciones mixtas en los que se encontraron 8 mezclas de DTUs diferentes: TcI-Doméstico/TcII/TcV, TcI-Doméstico/TcII, TcI-Doméstico/TcI-Selvático, TcI-Doméstico/Tc Selvático/TcII, TcI-Doméstico/TcI-Selvático/TcIII, TcI-Doméstico/TcIV, TcI Selvático/TcII, TcI-Selvático/TcII. En cuanto los genotipos encontrados en los pacientes infectados con TcI se logró la genotipificación en 289/301, de los cuales el 28.7% corresponden al Genotipos TcI-Selvático y el 71.3% al genotipo TcI Doméstico.

La distribución de DTUs y genotipos también se estudió de acuerdo a las fases clínicas, se analizó la diferencia de frecuencias entre pacientes de las diferentes fases clínicas, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre pacientes agudos y crónicos (Tabla 8), no se encontraron diferencias significativas entre pacientes en fase crónica indeterminada y fase crónica cardiaca (Tabla 9).

Tabla 8. Frecuencias de DTUs y genotipos TcI en pacientes en fase aguda y crónica enfermedad de Chagas

Fase clínica		Aguda				Crónica				p*
		n=68				n=332				
		n	(%)	IC(95%)		n	(%)	IC(95%)		
DTUs	TcI	54	79.4	69.3	88.9	241	72.6	67.8	77.4	0.25
	TcII	6	9.0	2.0	15.9	64	19.3	15.0	23.5	0.04
	TcIII	4	6.0	0.2	11.7	2	0.6	0.2	1.4	0.00
	TcV	-	-	-	-	2	0.6	0.2	1.4	0.53
	Mixto	4	6.0	0.2	11.7	23	6.9	4.2	9.7	0.15
TcI		n=48				n=235				
	Selvático	40	83.3	74.8	95.4	42	17.9	12.9	22.8	0.00
	Doméstico	8	16.6	4.6	25.2	193	82.1	77.2	87.0	0.00

*p<0.05

Tabla 9. Frecuencias de DTUs y genotipos TcI en pacientes en fase crónica indeterminada y crónica cardíaca de enfermedad de Chagas

Fase clínica		Crónica indeterminada				Crónica cardíaca			
		n=185				n=147			
		N	(%)	95%IC		N	(%)	95%IC	
DTUs	TcI	129	69.7	63.1	76.4	112	76.2	69.3	83.1
	TcII	41	22.2	16.1	28.2	23	15.6	9.7	21.6
	TcIII	2	1.1	0.4	2.6	-	-	-	-
	TcV	2	1.1	0.4	2.6	-	-	-	-
	Mixto	11	5.9	2.5	9.4	12	8.2	3.7	12.6
TcI		n=125				n=110			
	Selvático	21	16.8	10.2	23.4	21	19.09	11.7	26.5
	Doméstico	104	83.2	76.6	89.8	89	80.91	73.5	88.3

- **Cargas parasitarias según las DTUs y genotipos TcI**

Se determinaron las medianas de parasitemias según las DTUs y los genotipos de TcI. Se compararon las medianas de parasitemias, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las cargas parasitarias de TcI y TcII (p=0.0305) y entre TcII y TcIII (p=0.0082). No se encontraron diferencias entre las cargas parasitarias de los genotipos de TcI (Figura 12).

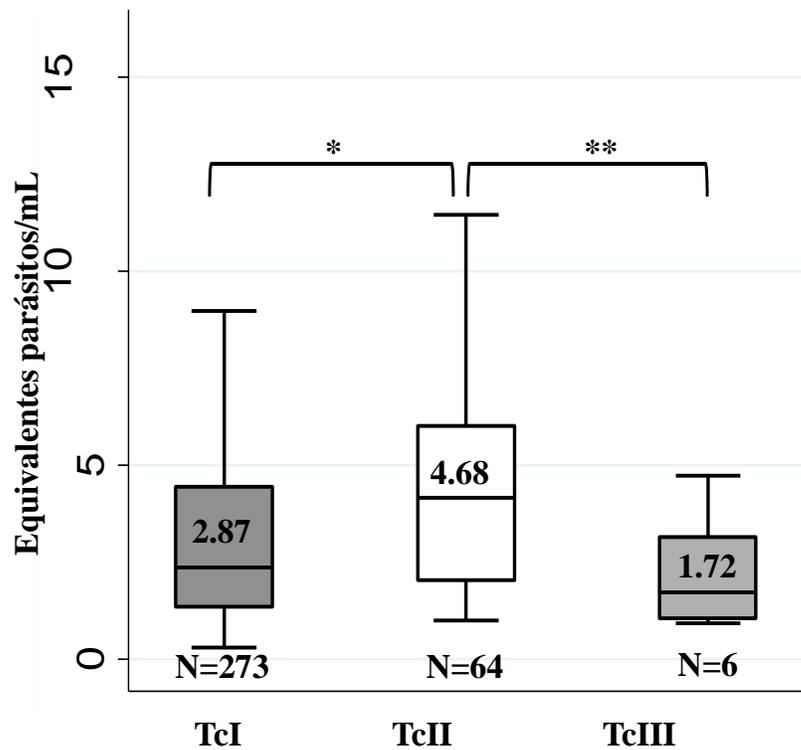


Figura 12. Cargas parasitarias según las DTUs. Se evidencian las parasitemias de las DTUs de *T. cruzi* en todos los pacientes analizados * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Adicionalmente, se determinaron las parasitemias de los genotipos de TcI según las fases clínicas. Encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos TcI Selvático y TcI-Doméstico en los pacientes en fase crónica ($p = 0.0000$), mientras que en fase aguda no se encontró diferencia estadísticamente significativa (Figura 13).

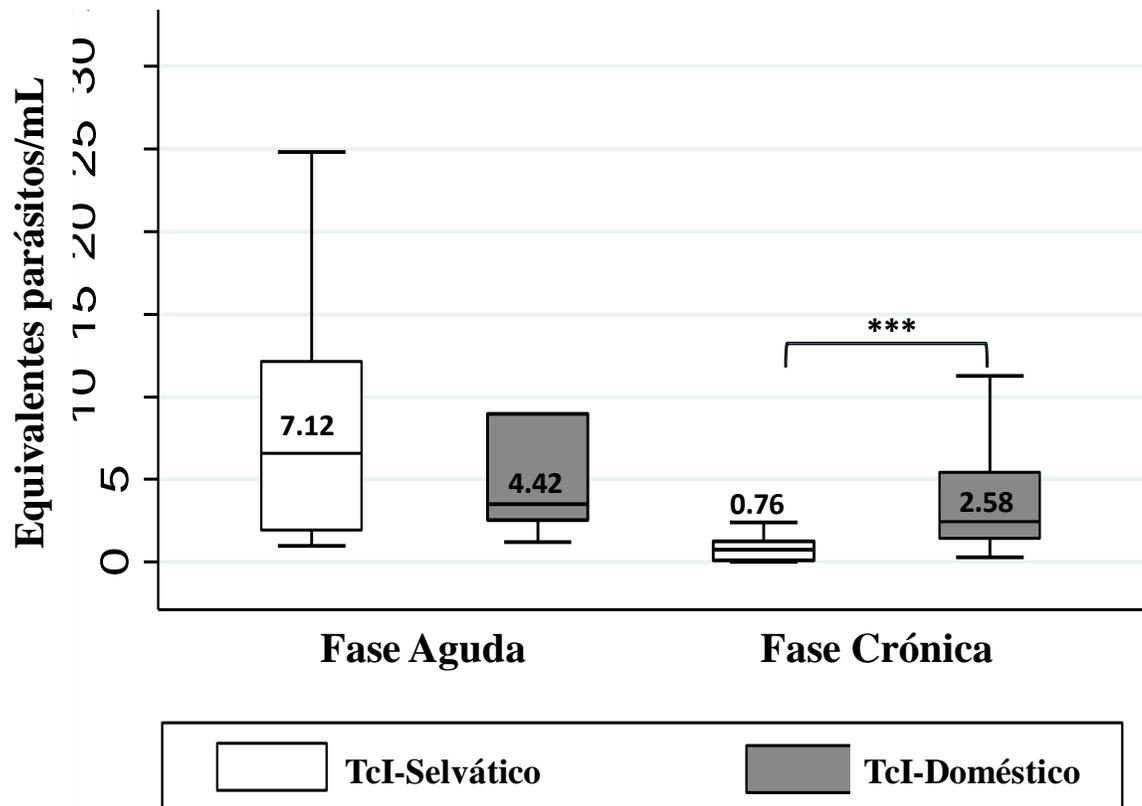


Figura 13. Cargas parasitarias de genotipos TcI según fase clínica. Cargas parasitarias de genotipos TcI Selvático y TcI Doméstico en las fases aguda y crónica. *** $p < 0.001$.

- **Capacidades operativas de pruebas moleculares según las DTUs y genotipos de TcI**

Se determinaron las capacidades operativas en las 406 muestras en las que se logró la detección de *T. cruzi* (Tablas 10 y Tabla 11).

Tabla 10. Capacidades operativas con la DTUs TcI y TcII

Capacidades Operativas	TcI (n=301)	
	qPCR (IC:95%)	cPCR (IC:95%)
Sensibilidad	90.37% (86.51. 93.21)	82.06% (77.33. 85.98)
Especificidad	5.263% (2.434. 11.01)	21.93% (15.32. 30.37)
VPP	71.58% (66.85. 75.88)	73.51% (68.55. 77.95)
VPN	17.14% (8.103. 32.68)	31.65% (22.45. 42.55)
Precisión	66.99% (62.33. 71.34)	65.54% (60.85. 69.95)
LR+	0.9539 (0.936 - 0.9721)	1.051 (1.026 - 1.076)
LR-	1.831 (0.004782 - 700.8)	0.8181 (0.5968 - 1.121)
K	0.05571 (-0.132 - 0.02063)	0.0441 (-0.04944 - 0.1376)

<i>Capacidades Operativas</i>	TcII (n=70)	
	<i>qPCR</i> (<i>IC:95%</i>)	<i>cPCR</i> (<i>IC:95%</i>)
<i>Sensibilidad</i>	82.06% (77.33. 85.98)	82.86% (72.38. 89.91)
<i>Especificidad</i>	8.406% (5.916. 11.81)	19.42% (15.59. 23.92)
<i>VPP</i>	16.84% (13.42. 20.93)	17.26% (13.6. 21.67)
<i>VPN</i>	82.86% (67.32. 91.9)	84.81% (75.3. 91.09)
<i>Precisión</i>	22.41% (18.66. 26.66)	30.12% (25.91. 34.7)
<i>LR+</i>	0.9982 (0.9892 - 1.007)	1.028 (1.014 - 1.043)
<i>LR-</i>	1.02 (0.3522 - 2.952)	0.8827 (0.664 - 1.173)
<i>K</i>	0.000599 (-0.02642 - 0.02522)	0.009057 (-0.03106 - 0.04917)

Tabla 11. Capacidades operativas con los genotipos TcI Selvático y TcI Doméstico

<i>Capacidades Operativas</i>	TcI Selvático (n=83)	
	<i>qPCR</i> (<i>IC:95%</i>)	<i>cPCR</i> (<i>IC:95%</i>)
<i>Sensibilidad</i>	89.16% (80.66. 94.19)	83.13% (73.66. 89.68)
<i>Especificidad</i>	7.831% (5.4. 11.23)	19.58% (15.67. 24.18)
<i>VPP</i>	19.47% (15.81. 23.75)	20.54% (16.56. 25.18)
<i>VPN</i>	74.29% (57.93. 85.84)	82.28% (72.42. 89.14)
<i>Precisión</i>	24.1% (20.23. 28.44)	32.29% (27.97. 36.93)
<i>LR+</i>	0.9673 (0.9581 - 0.9767)	1.034 (1.02 - 1.047)
<i>LR-</i>	1.385 (0.4586 - 4.18)	0.8615 (0.6617 - 1.122)
<i>K</i>	0.01286 (-0.0414 - 0.01568)	0.01265 (-0.03141 - 0.05671)

<i>Capacidades Operativas</i>	TcI Doméstico (n=206)	
	<i>qPCR</i> (<i>IC:95%</i>)	<i>cPCR</i> (<i>IC:95%</i>)
<i>Sensibilidad</i>	90.29% (85.48. 93.63)	81.55% (75.7. 86.26)
<i>Especificidad</i>	7.177% (4.397. 11.5)	8.197% (5.03. 13.08)
<i>VPP</i>	48.95% (43.96. 53.96)	50% (44.68. 55.32)
<i>VPN</i>	42.86% (27.98. 59.14)	28.3% (17.97. 41.57)
<i>Precisión</i>	48.43% (43.66. 53.23)	47.04% (42.14. 52.01)
<i>LR+</i>	0.9727 (0.9619 - 0.9837)	0.8883 (0.8757 - 0.9011)
<i>LR-</i>	1.353 (0.2263 - 8.086)	2.25 (0.4947 - 10.24)

K	0.02516 (-0.07832 - 0.02799)	0.1067 (-0.1779 - -0.03561)
----------	------------------------------	-----------------------------

5.1.1.3 Discusión

- *Positividad y cargas parasitarias de las pruebas moleculares en las diferentes fases de la enfermedad*

En cuanto a la positividad de las muestras en las diferentes fases de la enfermedad de Chagas. En fase aguda (qPCR: 95.7%/cPCR:88.5%), tiene concordancia con lo reportado previamente (9,12,28,230–232). En la fase crónica la positividad fue en qPCR de 64.2% (Crónica indeterminada: 68.0% y crónica cardiaca: 59.1%) y en cPCR fue 56.8% (Crónica indeterminada: 55.4% y crónica cardiaca: 58.6%), estos resultados están en concordancia con varios estudios en los que el número de pacientes es similar o superior al analizado en este estudio (8,48,95,133,134) en los que los porcentajes de positividad apenas superan el 50%. Esto puede deberse a la fluctuación de la parasitemia durante la fase crónica y es de gran importancia tener en cuenta otras alternativas como el uso de un conjunto de muestras recolectadas en diferentes tiempos por cada paciente o aumentar la cantidad de muestra de la que parte la extracción de ADN, como es el caso de algunos virus (233,234) .

Finalmente, se observó dentro del grupo de pacientes con factores de riesgo una positividad de 3.6% (4 casos), esto puede ser consecuencia de inmunosupresión en estos pacientes, lo que impide la detección de anticuerpos; también puede deberse a que la infección sea muy reciente y por lo tanto dentro de los mecanismos de evasión inmune del parásito se genera un estado de inmunosupresión que produce baja producción de anticuerpos específicos para *T. cruzi* y por ende las pruebas serológicas se encontrarán negativas (235). Los valores de ELISA en 3 de 4 de estos pacientes se encontraban cerca al punto de corte y adicionalmente uno de los pacientes provenía de Casanare que es zona endémica y dos pacientes presentaban edades de 21 y 23, por lo que en ellos es posible que la infección fuese reciente.

En cuanto a las cargas parasitarias obtenidas, se observó que la mediana de carga parasitaria fue mayor en los pacientes en fase aguda en comparación con los de fase crónica, que normalmente es de esperarse dada la dinámica de parasitemia en la enfermedad. La mediana en fase aguda reportada en nuestro estudio es menor que las reportadas previamente por otros estudios, esto puede deberse a que la DTU utilizada en la curva fue TcI que presentan un menor número de copias del blanco y también a que en la mayoría de los casos la qPCR fue realizada aproximadamente entre el primer y segundo mes posteriores al contacto con el parásito periodo en el que empieza a disminuir la parasitemia (9,12).

En cuanto al grupo de pacientes crónicos las medianas de parasitemias aquí reportadas son similares a las reportadas previamente para Colombia (8,12). Adicionalmente la diferencia de medianas entre las fases crónica indeterminada y crónica cardiaca fue estadísticamente significativa, siendo mayor en la fase crónica indeterminada a diferencia los hallazgos realizados por Ramírez et al, 2015 (12), en los que no se encontró diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, nuestros resultados están acordes con lo observado en modelos

murinos donde sí se han observado diferencias (236), y en concordancia con la historia natural de la enfermedad en la que la parasitemia disminuye con la cronicidad de la enfermedad (81).

- ***Capacidades operativas de técnicas moleculares para diagnóstico de enfermedad de Chagas***

Los resultados obtenidos para el diagnóstico en fase aguda fueron muy óptimos en términos de sensibilidad (qPCR: 95.7%), especificidad (qPCR: 100.0%) y el AUROC (qPCR: 0.9786) evidenciando a su vez el desempeño superior de la qPCR en comparación con la cPCR, así como su elevada capacidad discriminativa, es decir la capacidad de la prueba para discriminar pacientes sanos de pacientes enfermos, los resultados obtenidos concuerdan con los de sensibilidad y especificidad reportados previamente para esta fase clínica (9,12).

En cuanto a la fase crónica, la sensibilidad para qPCR fue de 64.2% y para cPCR de 56.8%, similar a los resultados obtenidos previamente que para qPCR han mostrado sensibilidad entre 60-80% y para cPCR entre 20-70%. (5,7,8,12,95,237). Estos resultados en cuanto a la sensibilidad pueden deberse a las bajas e intermitentes parasitemias durante la fase crónica y pueden mejorar analizando muestras seriadas para cada paciente como se ha visto en algunos estudios en los que por ejemplo la sensibilidad mejoró de 69.2% a 85.2% con la adición de una segunda muestra (233,234) o realizando la extracción de ADN de un volumen de muestra mayor al utilizado hasta el momento.

Es importante, el análisis de los valores predictivos (Tablas 4 y 5), estos valores reflejan que un resultado positivo puede confirmar el diagnóstico, siendo útil en pacientes con inmunosupresión y aquellos casos en los que existen discordancias de las pruebas serológicas aplicadas. A su vez los VPN y LR- y la baja concordancia con el estándar de oro, evidencian la baja capacidad de las técnicas moleculares para descartar el diagnóstico de la enfermedad, así un resultado negativo no descarta la presencia de la enfermedad y será necesario usar pruebas adicionales para descartar el diagnóstico. Sin embargo, en cuanto a la capacidad discriminatoria de las técnicas mostró ser buena, siendo mejor para la qPCR que la cPCR. En el caso de los pacientes crónicos indeterminados y crónicos cardíacos, el comportamiento de las características operativas de las técnicas moleculares fue muy similar, mostrando mejores resultados durante la fase crónica indeterminada. Adicionalmente, los resultados de AUROC sugieren que la capacidad discriminativa de la qPCR y la cPCR es igual para la fase crónica cardíaca, mientras que en fase indeterminada tiene mayor capacidad discriminativa la qPCR que la cPCR.

Estudios previos han mostrado que el número de copias de ADN satélite nuclear es diferente para cada una de las DTUs, siendo la TcI la DTU con menor número de copias (238–240). Adicionalmente, en los procesos de validación analítica utilizando cepas de diferentes DTUs, se ha observado que la prueba es capaz de detectar todas las DTUs, sin embargo se han identificado pequeñas variaciones en cuanto al comportamiento de los Cts en la curva estándar y la sensibilidad analítica (8,9,12). En concordancia, nosotros observamos que la

sensibilidad de las pruebas moleculares entre las dos DTUs de mayor frecuencia (TcI/TcII), fueron similares, más para la cPCR que para la qPCR, sin embargo, las pequeñas diferencias pueden deberse al uso de TcI para la curva estándar en la qPCR y la elevada prevalencia de esta DTU en el país (47,48,227).

Adicionalmente, en cuanto a la edad, se observó que el comportamiento de las capacidades operativas fue mucho más óptimo en el grupo de pacientes de menor edad y disminuye gradualmente en los grupos de mayor edad. Estos hallazgos corresponden con los descritos previamente en los que se ha descrito disminución de la sensibilidad de las pruebas moleculares en relación con el aumento de la edad (241,242). Adicionalmente, si se analizan los porcentajes de positividad de las técnicas moleculares en estudios en niños menores de 18 años en comparación con grupos etarios mayores, se observan que a menor edad la detección de *T. cruzi* es mayor (48,132,133,243–246).

- *Distribución de DTUs y Genotipos de TcI en pacientes con enfermedad de Chagas*

La DTU que presentó mayor frecuencia fue TcI, tanto en pacientes agudos como crónicos, que concuerda con los hallazgos descritos previamente en Colombia, en los que se rescata la amplia distribución de esta DTU en todo el circuito epidemiológico, ciclos epidemiológicos y diferentes fases de la enfermedad, así como su asociación con algunas manifestaciones clínicas de la cardiopatía chagásica (28,47,48,25). En segundo lugar se encuentra TcII, con mayor frecuencia en pacientes crónicos que agudos, esto se relaciona con que esta DTU circula principalmente en ciclos domésticos (47).

En cuanto a las cargas parasitarias de las DTUs detectadas, se observó que TcII, presentó mayor mediana de parasitemia que las demás DTUs, lo que concuerda con el número de copias que se ha reportado del ADN satélite nuclear, siendo mayor para TcII que para TcI (238,239,247). Este hallazgo resalta la importancia de usar la DTU más representativa, teniendo en cuenta la distribución geográfica de estas como ha sido recomendado en los procesos de validación analítica (8,9,12). Adicionalmente, en modelos murinos se ha observado que TcII presenta mayores parasitemias que TcI, tanto al realizar las infecciones individuales, como en infecciones mixtas (248).

En este estudio los casos agudos corresponden a casos ocasionados por transmisión vectorial y a casos de posible transmisión oral, en todos se observó principalmente TcI (TcI-Selvático), TcII y TcIII. Estos datos están en concordancia con los datos previamente documentados para pacientes agudos en los que las DTUs encontradas son principalmente aquellas relacionadas con el ciclo silvestre (TcI-Selvático, TcIII y TcIV) (28,43,49,76,228,229,232,249–251). En cuanto a las parasitemias de los genotipos de TcI en fase aguda no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Adicionalmente, un hallazgo importante fue la detección de TcV en los pacientes estudiados. Se ha informado la presencia de TcV, en caninos de la Orinoquía colombiana (47). Este es el primer reporte en Colombia de esta DTU en humanos, adicionalmente esta DTU se ha reportado ampliamente

en países del cono sur como Bolivia, Brasil, Argentina y Chile (49), por esta razón es de relevancia el estudio de TcV en países del norte de América Latina.

Recientemente, se ha destacado el papel de TcI-Doméstico, de la que varios estudios han descrito mediante un amplia gama de marcadores moleculares su asociación con la infección en humanos y ciclos domésticos de transmisión (28,45,49,51,52,25,252). Adicionalmente, se ha demostrado que TcI-Doméstico ha mostrado un proceso de domiciliación gradual con el tiempo y se ha asociado con manifestaciones clínicas de la cardiopatía chagásica (48,52,227).

Otros estudios evidenciaron la presencia del genotipo TcI-Selvático en tejido y TcI-Doméstico en sangre de pacientes con cardiopatía chagásica (119). En modelos murinos se evidenció que TcI-Doméstico produjo una elevada parasitemia y baja invasión en tejidos, proceso que le permite una adaptación con el hospedero prolongando su permanencia y generar cronicidad, proceso contrario a lo ocurrido con las cepas selváticas (253). En acuerdo con estos hallazgos previos, nuestros resultados muestran que en pacientes crónicos la frecuencia y parasitemia del genotipo TcI-Doméstico son significativamente mayores en los pacientes crónicos que en los pacientes agudos y en comparación con las cepas silvestres, apoyando la hipótesis de que este genotipo emergente puede ser el responsable del proceso crónico en pacientes con cardiomiopatía chagásica.

5.1.2 Diagnóstico y epidemiología molecular de *T. cruzi* para seguimiento del tratamiento etiológico en pacientes crónicos con Enfermedad de Chagas

5.1.2.1 Metodología

Se incluyeron en el estudio 300 pacientes quienes solicitaron diagnóstico y tratamiento etiológico para enfermedad de Chagas en el laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud (INS), en el periodo comprendido entre los años 2004 a 2015. Se seleccionaron los pacientes según los siguientes criterios de inclusión:

1. Tener diagnóstico de enfermedad de Chagas en fase crónica mediante serología
2. Haber recibido tratamiento etiológico con Benzonidazol y Nifurtimox
3. Contar con muestra pre y posterior al tratamiento etiológico.

Dado que la prueba que mostró mejor sensibilidad fue la qPCR (descrita previamente), se utilizó esta técnica para realizar seguimiento al tratamiento etiológico. Adicionalmente, se utilizaron las técnicas serológicas previamente descritas en el punto 5.1.1.1.

5.1.2.2 Resultados

- Cargas parasitarias pre y post tratamiento etiológico

Se incluyeron 143 pacientes, diagnosticados en el INS y que recibieron tratamiento etiológico en el periodo comprendido entre 2004 y 2014, cuyas características principales se muestran en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Características generales de pacientes quienes recibieron tratamiento etiológico

<i>Características Generales</i>	<i>n= 143</i>
<i>Edad, mediana (Q1-Q3)</i>	<i>47 (46-48)</i>
<i>Sexo, n (%)</i>	
<i>Femenino</i>	<i>80(55.9)</i>
<i>Masculino</i>	<i>63(44.0)</i>
<i>Tratamiento etiológico n (%)</i>	
<i>Nifurtimox</i>	<i>61(42.7)</i>
<i>Benzonidazol</i>	<i>82(57.3)</i>

Se analizaron los resultados de las pruebas serológicas y qPCR pre y pos tratamiento, el tiempo transcurrido entre la muestra pre y la post, fue el correspondiente entre el final del tratamiento y diez años después, en los pacientes con más de una muestra post tratamiento, se tomó en cuenta la última muestra disponible. Los resultados de las pruebas se encuentran en la (Tabla 13).

Para el caso de qPCR fueron analizadas las cargas parasitarias pre y post tratamiento etiológico. (Figura 14). En cuanto a la prueba de ELISA, se analizaron las diferencias de medianas de las absorbancias (Figura 15).

Tabla 13. Resultados positivos mediante serología y qPCR pre y post tratamiento etiológico

<i>Pruebas diagnósticas (n)</i>	<i>Positivos Pre tratamiento</i>		<i>Positivos Post tratamiento</i>		<i>P</i>
	<i>143</i>	<i>%</i>	<i>143</i>	<i>%</i>	
<i>Serológicas</i>					
<i>IFI-ELISA-HAI</i>	<i>143</i>	<i>100.0</i>	<i>139</i>	<i>98.0</i>	<i>0.089</i>
<i>Nifurtimox (n=61)</i>	<i>61</i>	<i>100.0</i>	<i>59</i>	<i>96.7</i>	<i>0.1525</i>
<i>Benzonidazol (n=82)</i>	<i>82</i>	<i>100.0</i>	<i>81</i>	<i>98.8</i>	<i>0.3198</i>
<i>Moleculares</i>					
<i>qPCR (n=143)</i>	<i>98</i>	<i>68.5</i>	<i>31</i>	<i>21.7</i>	<i>0.0000</i>

<i>qPCR</i> (n=98)	98	100.0	19	19.3	0.0000
<i>Nifurtimox</i> (n=61)	41	67.2	14	23.0	0.0000
<i>Nifurtimox*</i> (n=41)	41	100.0	7	17.0	0.0000
<i>Benzonidazol</i> (n=82)	57	58.2	17	20.7	0.0000
<i>Benzonidazol*</i> (n=57)	57	100.0	12	21.0	0.0000

***Sólo se incluyen pacientes positivos pre-tratamiento**

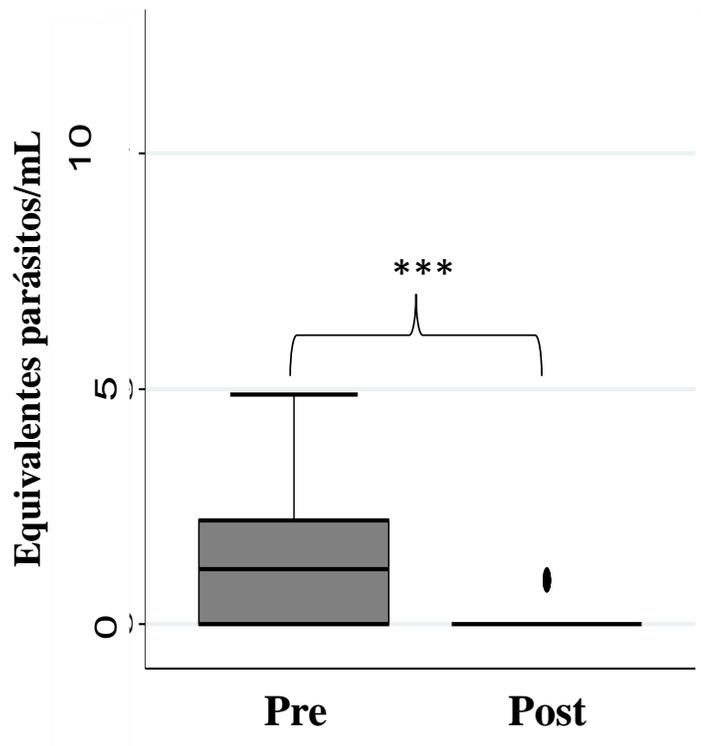


Figura 14. Cargas parasitarias pre y post tratamiento etiológico. Se muestran las cargas parasitarias observadas pre y post tratamiento en los 143 pacientes analizados.

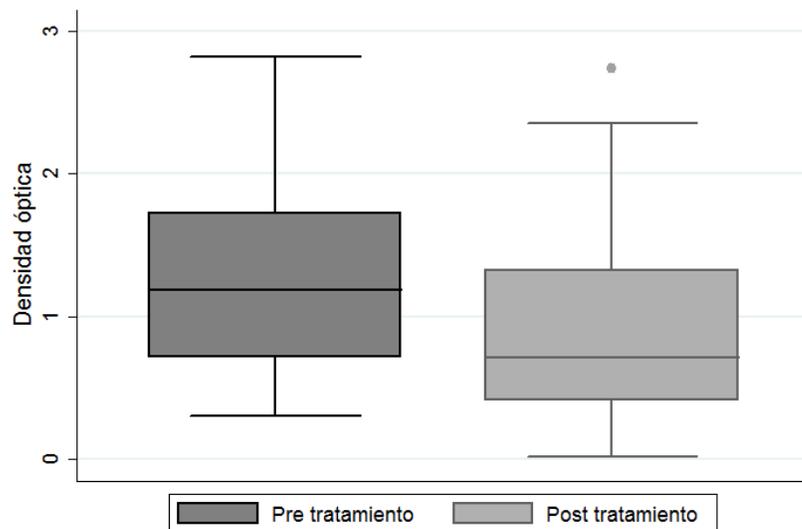


Figura 15. Absorbancias de ELISA. Densidades ópticas observadas pre y post tratamiento en los 143 pacientes analizados.

Se discriminaron y analizaron las medianas de parasitemias de *T. cruzi* y las absorbancias del ELISA, según el tratamiento (Nifurtimox o Benzonidazol) (Tabla 14).

Tabla 14. Comparación de cargas parasitarias y absorbancias de ELISA pre y post tratamiento.

	Pre tratamiento	<i>n</i>	Pos tratamiento	<i>p</i>
Mediana parasitemia	2.16(1.8-2.96)	98	0.00 (0.00-0.00)	0.000
<i>Nifurtimox (n=41)</i>	2.51 (2.51-1.74)	41	0.00 (0.00-0.00)	0.000
<i>Benzonidazol (n=57)</i>	2.12 (1.69-2.97)	57	0.00 (0.00-0.00)	0.000
Absorbancia ELISA	1.19 (1.06-1.37)	143	0.71 (0.56-0.87)	0.000
<i>Nifurtimox (n=61)</i>	1.15(1.02-1.29)	61	0.61(0.43-1.00)	0.011
<i>Benzonidazol (n=82)</i>	1.30 (0.99-1.66)	82	0.77 (0.56-0.91)	0.000

Finalmente, se determinaron las frecuencias de las DTUs presentes en las muestras pre y post tratamiento etiológico (Tabla 15).

Tabla 15. Frecuencias de DTUs y genotipos TcI detectados pre y pos tratamiento etiológico

	Pre (n=51)		Post (n=13)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Benzonidazol				
TcI-Doméstico	29	56.9	9	69.2
TcI-Doméstico/TcII	3	5.9	2(TcII)	15.4

TcII	12	23.5	2	15.4
TcIII	1	2.0		
TcI-Selvático	4	7.8		
TcI-Selvático/TcII	2	3.9		
Nifurtimox	Pre (n=35)		Post (n=12)	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
TcI-Doméstico	15	42.9	10	83.3
TcII	12	34.3		
TcI-Selvático	5	14.3		
TcI-Selvático/TcII	3	8.6	2(TcII)	16.7

5.1.2.3 Discusión

- **Pruebas moleculares para seguimiento de tratamiento etiológico en pacientes crónicos con enfermedad de Chagas.**

Los resultados obtenidos en las pruebas serológicas pre y post tratamiento, evidencian una negativización de estas pruebas del 2.0% (Tabla 13.) que corresponde a 3 casos, 2 tratados con Nifurtimox y 1 con Benzonidazol, las muestras post fueron tomadas entre 2 y 5 años post tratamiento, adicionalmente los 3 casos presentaron qPCR positiva pre tratamiento y qPCR negativa post tratamiento. Estos resultados concuerdan con muchos de los estudios reportados en la literatura en los que la frecuencia de seroconversión en pacientes crónicos del grupo etario es muy baja o incluso nula (233,234,254–258). Aunque debe tenerse en cuenta que otros estudios muestran porcentajes de seroconversión superiores al 15%, sin embargo cabe resaltar que estos estudios corresponden a pacientes en fase crónica jóvenes (Menores de 18 años) y algunos a pacientes adultos, pero con tiempos de seguimiento superiores a 10 años (132,244–246,259–264)

En cuanto a los resultados de la qPCR se observó que hubo diferencias estadísticamente significativas de los resultados positivos pre y post tratamiento. Evidenciando una disminución del porcentaje de positivos pre y post tratamiento, los resultados fueron significativos teniendo en cuenta los pacientes negativos pre tratamiento y positivos post-tratamiento o tomando únicamente los pacientes positivos pre tratamiento, se analizaron las dos posibilidades dado que la sensibilidad de la técnica es baja en los pacientes crónicos y eso pudo evitar que se detectará el parásito pre tratamiento.

Esto indica que efectivamente el tratamiento en primera instancia si produce disminución significativa de la positividad de la prueba de qPCR, en concordancia con lo observado en otros estudios similares en los que la frecuencias de positividad post tratamiento son menores al 50% de los pacientes (4,234,242,243,257,265–267) y difiere de otros estudios en los que se reportan frecuencias por encima del 50.0% (133,233,268,269). La discrepancia en los

resultados se debe a diferentes factores como el número de pacientes analizados, el protocolo de PCR utilizado y el estado de la enfermedad en los pacientes estudiados.

Se observó una persistencia del parásito en el 21.7% de los pacientes post tratamiento (23.0% tratados con Nifurtimox y 20.7% de los tratados con Benzonidazol) (Tabla 13). La persistencia de la positividad en este estudio fue baja y en este caso debe tenerse cuidado en la interpretación de los resultados negativos, dado que la sensibilidad de la técnica es baja, por esta razones es recomendable el uso de varias muestras como se ha realizado en algunos estudios en los que se observa que el aumento de muestras aumenta el porcentaje de positividad (133,233,234,242).

El porcentaje de positividad observado en este estudio puede deberse a varios aspectos, en 2 de los 31 pacientes puede deberse a reinfección, ya que estos pacientes viven en zona endémica, aunque vale la pena resaltar que no hubo casos en los que se detectarían DTUs diferentes post tratamiento a las encontradas pre tratamiento. En los demás pacientes, la positividad presente puede deberse a la persistencia de ADN post tratamiento, hasta el momento se ha descrito que está puede durar hasta dos años, en ese caso el 52.0 % de los pacientes positivos correspondían a seguimiento de primer y segundo año (241). Según lo anterior en el restante 48.0% de los casos positivos post tratamiento que corresponden a seguimientos de 2 a 10 años, se podría entonces contemplar la posibilidad de resistencia del parásito, tal como se ha observado en modelos *in vitro* y murinos (270,271).

En cuanto a las cargas parasitarias pre y post tratamiento mediante qPCR se observó disminución significativa de la mediana, incluso con los dos tratamientos. Estos resultados concuerdan con los reportados por Bianchi et al.,2015 (132) en niños menores de 18 años en los que también hubo disminución de la parasitemia y están en discordancia con otros estudios en los que no se observó disminución significativa de la parasitemia (268).

Recientemente se han publicado los resultados del ensayo clínico BENEFIT, que consistió en evaluar el tratamiento con Benzonidazol en pacientes con cardiopatía chagásica. En este ensayo clínico se encontró que el tratamiento logró disminuir la parasitemia, sin embargo, no se observó mejoría en la clínica. Adicionalmente, se observó que la respuesta al tratamiento fue variable según la localización geográfica, lo que eventualmente pueda relacionarse con la DTU presente previo al tratamiento (133).

Se resalta que el uso del tratamiento, eventualmente podría ser útil en pacientes en fase indeterminada, según los resultados de este trabajo los pacientes en fase indeterminada presentan mayor parasitemia que los pacientes en fase cardiaca por lo que si el tratamiento logra la eliminación de la parasitemia, es posible que se logre disminuir el daño cardiaco.

En cuanto a las DTUs, se confirma la detección de la DTU TcI Doméstico con mayor frecuencia en pacientes crónicos, seguido en menor frecuencia de la DTU TcII (Tabla 15). La detección post tratamiento de las DTUs corresponde a TcI Doméstico y TcII, llamando la atención que cuando existen infecciones mixtas de las dos predomina la persistencia de TcII.

El comportamiento post tratamiento es similar con los dos tratamientos etiológicos. Se ha descrito la persistencia post tratamiento etiológico de las DTUs TcI y TcII previamente en estudios en humanos, así como en modelos *in vitro*, incluso de TcII se han descrito varios grados de resistencia en diferentes clones (132,258,270–273).

En cuanto a TcI Doméstico, no se han descrito estudios donde se evidencie su persistencia post tratamiento o resistencia *in vitro*, sin embargo un estudio en cepas colombianas evidenció resistencia a Benzonidazol en el 16.0% de las cepas analizadas y resistencia parcial en 48.0% y teniendo en cuenta que en Colombia, la mayoría de cepas son TcI, probablemente algunas de ellas, corresponden a TcI Doméstico (271).

5.1.3 Diagnóstico y epidemiología molecular de *T. cruzi* en triatominos

5.1.3.1 Metodología

Se recolectaron 245 triatominos correspondientes a 6 especies, en 7 departamentos de Colombia (Antioquía, Casanare, Cesar, Guajira, Huila, Meta y Norte de Santander). Los insectos fueron identificados mediante claves taxonómicas y posteriormente fueron almacenados en etanol al 70% hasta su procesamiento.

Se realizó extracción de ADN mediante el Kit ZR Tissue & Insect DNA MiniPrep Zymo™, posteriormente se realizó PCR en tiempo real de punto final para detección de ADN satélite de *T. cruzi* según lo descrito por Duffy et al., 2013 (9) y bajo las mismas condiciones descritas previamente (5.1.1.1), a diferencia de la interpretación y control interno de amplificación.

En cuanto a la interpretación, dado que no se realizó cuantificación del ADN de *T. cruzi*, se interpreta como resultado positivo la amplificación del ADN en cualquier ciclo de amplificación y como resultado negativo la no amplificación. Se utilizó como control de amplificación interno la subunidad ribosomal 12S de la familia Triatominae según las condiciones e iniciadores descritos por Uehara et al, 2012 (274).

Posteriormente, los resultados positivos mediante qPCR, se les realizó amplificación del quinoplasto para diferenciar *T. cruzi* de *T. rangeli* y se realizó identificación de DTUs y genotipos de TcI, según lo descrito previamente en el punto 5.1.1.1. Adicionalmente, se realizó la identificación de preferencias alimenticias mediante PCR-HRM y secuenciación de Citocromo B según lo descrito previamente por Peña et al., 2012 (222), estos métodos permiten la detección de 14 especies de reservorios involucrados en los ciclos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas (Tabla 16).

Tabla 16. Especies de mamíferos detectados mediante HRM de *citocromo b* en triatominos

Especie	Nombre común	Temperatura melting
---------	--------------	---------------------

<i>Didelphis marsupialis</i>	Zarigueya	81.02 ± 0.09
<i>Mus musculus</i>	Ratón	81.63 ± 0.12
<i>Bos Taurus</i>	Toro	81.76 ± 0.49
<i>Capra aegagrus</i>	Cabra	81.88 ± 0.05
<i>Canis lupus familiaris</i>	Canino	82.29 ± 0.08
<i>Ovis aries</i>	Oveja	82.29 ± 0.03
<i>Equus caballus</i>	Caballo	82.56 ± 0.08
<i>Sus scrofa</i>	Cerdo	82.58 ± 0.05
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo	82.69 ± 0.05
<i>Felis catus</i>	Gato	83.46 ± 0.09
<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	83.55 ± 0.05
<i>Equus asinus</i>	Burro	84.39 ± 0.04
<i>Homo sapiens</i>	Humano	85.79 ± 0.05
<i>Gallus</i>	Gallina	86.27 ± 0.05

Se calcularon frecuencias de acuerdo a las especies, ecótopos, infección por *T. cruzi*, DTUs, genotipos TcI y fuentes alimenticias. Mediante regresión logística se estimó el riesgo de positividad para *T. cruzi* (OR, IC95%), según características demográficas y eco-epidemiológicas.

5.1.3.2 Resultados

- Detección de *T. cruzi* en diferentes especies de triatominos

Los ejemplares se recolectaron en los departamentos de Guajira, Antioquia, Cesar, Norte de Santander, Meta, Casanare y Huila (Figura 16). La cantidad de ejemplares por especie se describen en la (Figura 17).

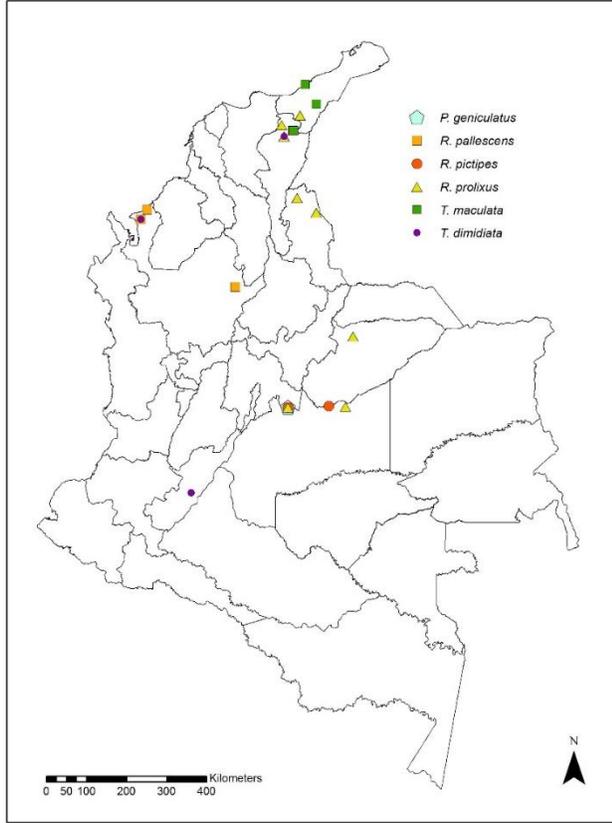


Figura 16. Distribución de especies de Triatominos recolectados en Colombia.

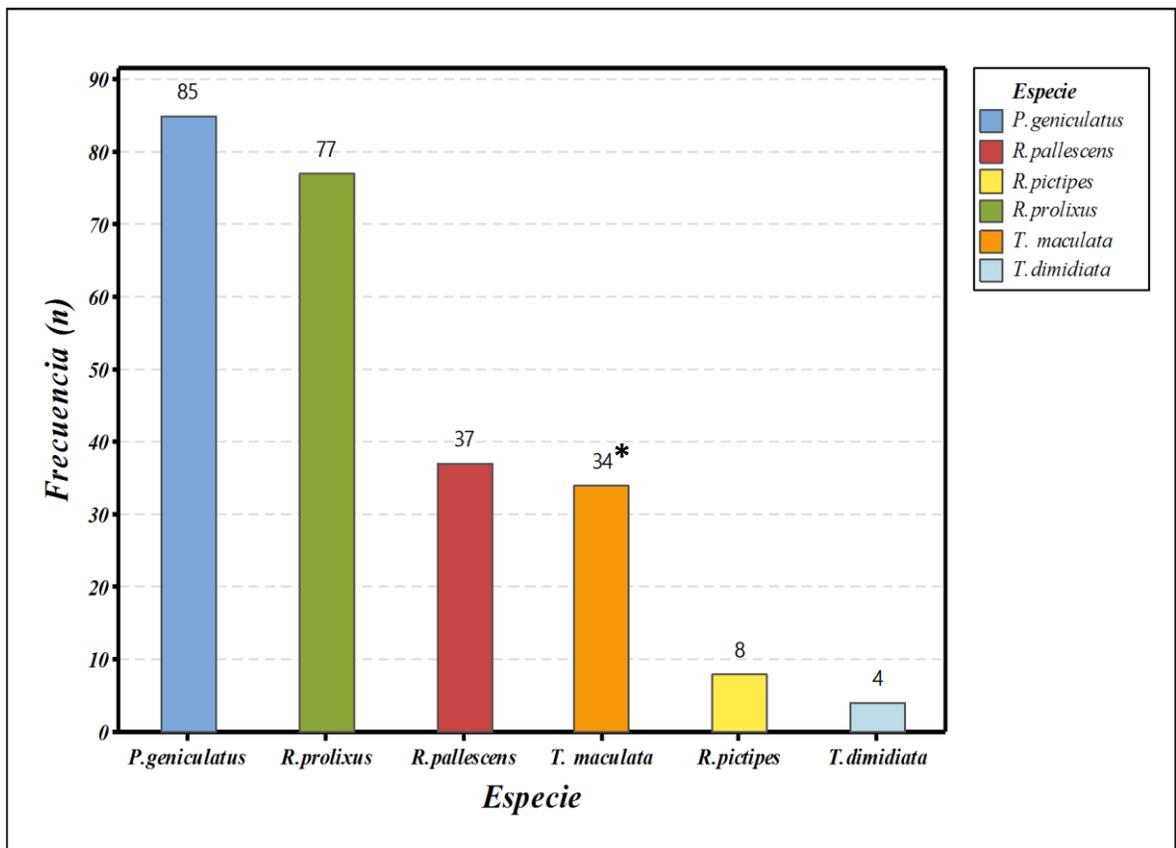


Figura 17. Número de ejemplares por especie de triatominos recolectados. Se recolectaron 245 ejemplares de seis especies diferentes *P. geniculatus*, *R. prolixus*, *R. pallescens*, *T. maculata*, *R. pictipes* y *T. dimidiata*. *Publicado en Gomez-Melendro y colaboradores en 2014 (275).

De todas las especies recolectadas a excepción de *T. dimidiata* se logró la recolección de ejemplares de todos los ciclos epidemiológicos de transmisión. (Figura 18).

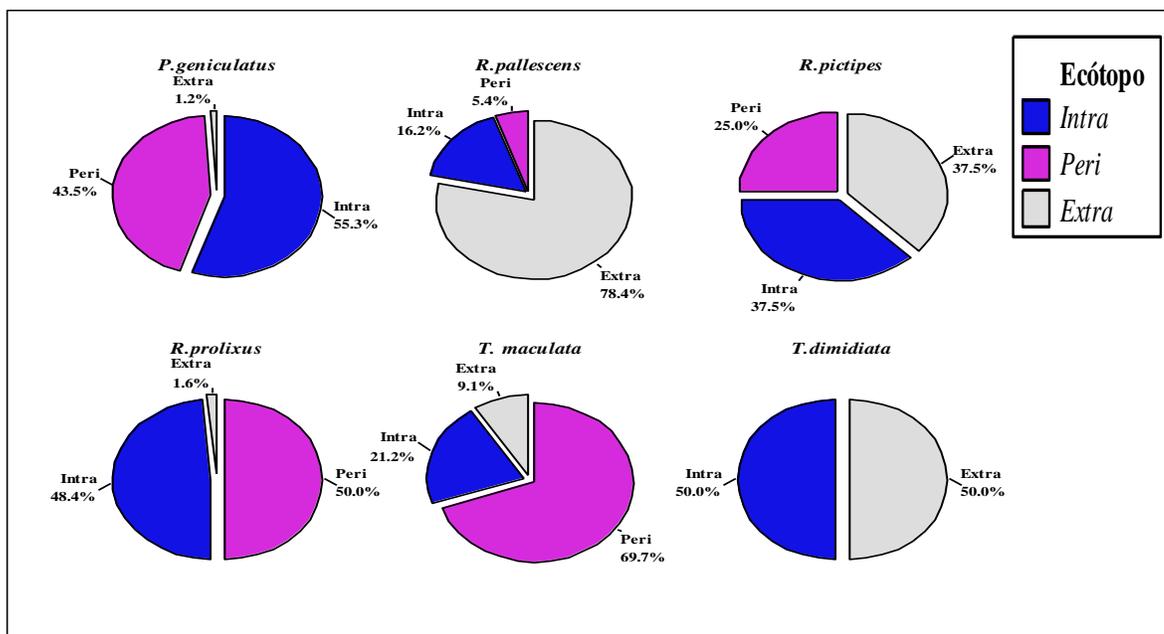


Figura 18. Frecuencia de ecótopos según especies de triatominos. Se recolectaron los 245 ejemplares en los ecótopos Intra: Intradomiciliar, Peri: Peridomiciliar y Extra: Extradomiciliar.

En cuanto a la infección con *T. cruzi*, el porcentaje de infección total fue de 61.2% (N=150). En el total de triatominos positivos la especie con mayor porcentaje de positividad fue *P. geniculatus* con 39.7%, seguido de *R. prolixus* (28.5%) y *T. maculata* (15.2%). (Figura 19). El análisis de positividad dentro de cada una de las especies se observa en la (Tabla 20).

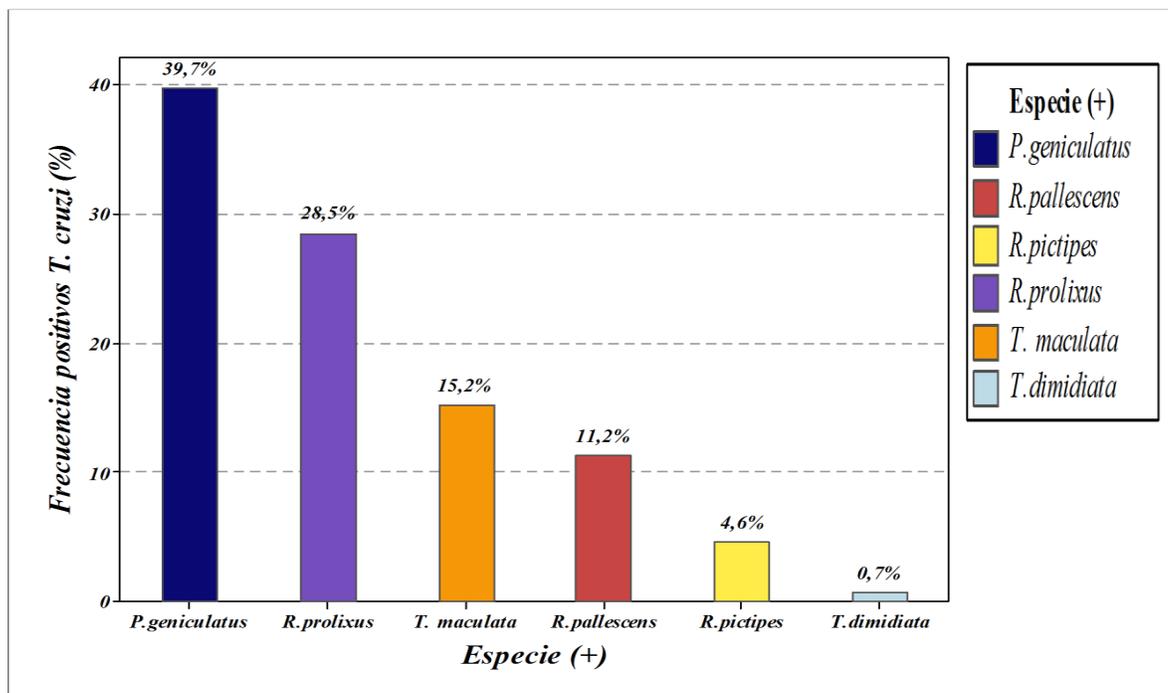


Figura 19. Frecuencias de triatomines positivos para *T. cruzi* y posición de cada una de las especies. Estas frecuencias fueron calculadas utilizando como muestra únicamente los triatomines positivos para *T. cruzi* (N=150).

Adicionalmente, se observó positividad de *T. cruzi* con respecto a diferentes características demográficas y eco-epidemiológicas. (Ecótopos, departamentos, estadios, fuentes de alimentación y DTUs) (Tablas 17 a 19).

Tabla 17. Positividad de *T. cruzi* de acuerdo a la localización geográfica.

Ciudad	N	%positividad	IC95%
Meta	69	46.0	38.0-53.9
Guajira	32	21.3	14.7-27.8
Cesar	23	15.3	9.5-21.1
Antioquía	12	8.0	3.6-12.3
Norte de Santander	9	6.0	2.2-9.8
Casanare	3	2.0	0.4-5.7
Huila	1	0.7	0.02-3.6

Valledupar	<i>l</i>	0.7	0.02-3.6
-------------------	----------	-----	----------

Tabla 18. Positividad de *T. cruzi* de acuerdo a ecótopos de recolección.

Ecótopos	N	%positividad	IC95%
Peridomicilio	68	45.3	39.7-56.1
Intradomicilio	52	34.7	28.7-44.5
Extradomicilio	22	14.7	9.5-21.4

Tabla 19. Estadio de insectos positivos para *T. cruzi*.

Estadio	N	%positividad	IC95%
Hembra	76	50.7%	44.3-60.5
Macho	43	28.7%	22.2-37.1
Ninfa	26	17.3%	11.7-24.2

- Preferencias alimentarias de diferentes especies de triatomos

Se encontraron 9 fuentes de alimentación diferentes en los 245 insectos analizados. El 59.3% de los insectos se alimentó de sangre humana, 21.1% de animales domésticos y peridomésticos y 19.6% de animales silvestres (Figura 20). En cuanto a la alimentación según las especies, los vectores que más variedad en las fuentes de alimentación presentaron fueron *P. geniculatus*, *R. prolixus* y *R. pallens* (Figura 21).

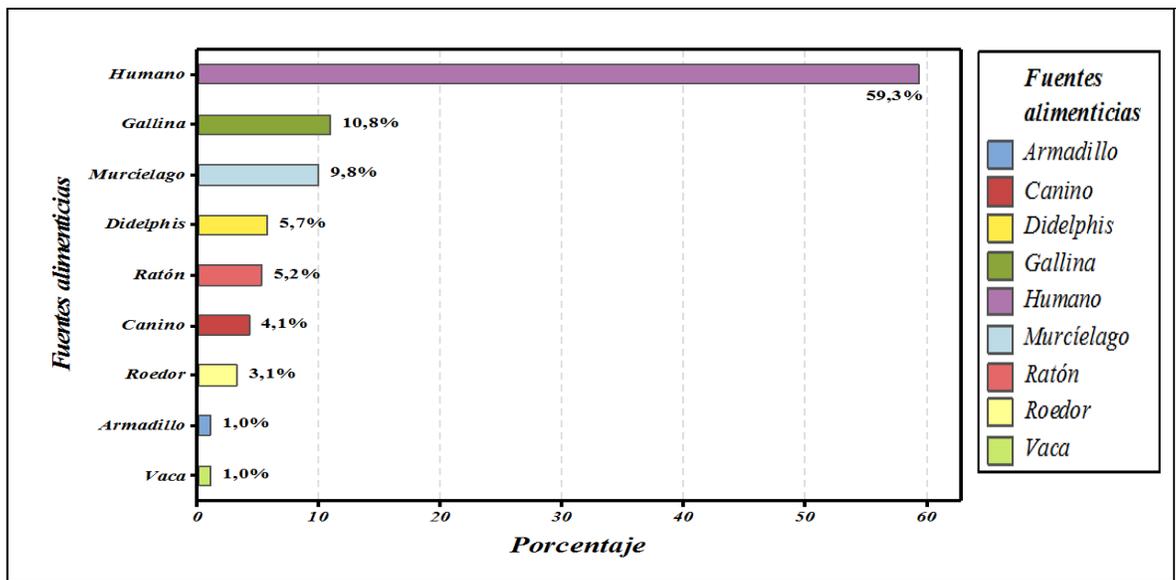


Figura 20. Preferencias alimenticias encontradas en triatominos analizados.

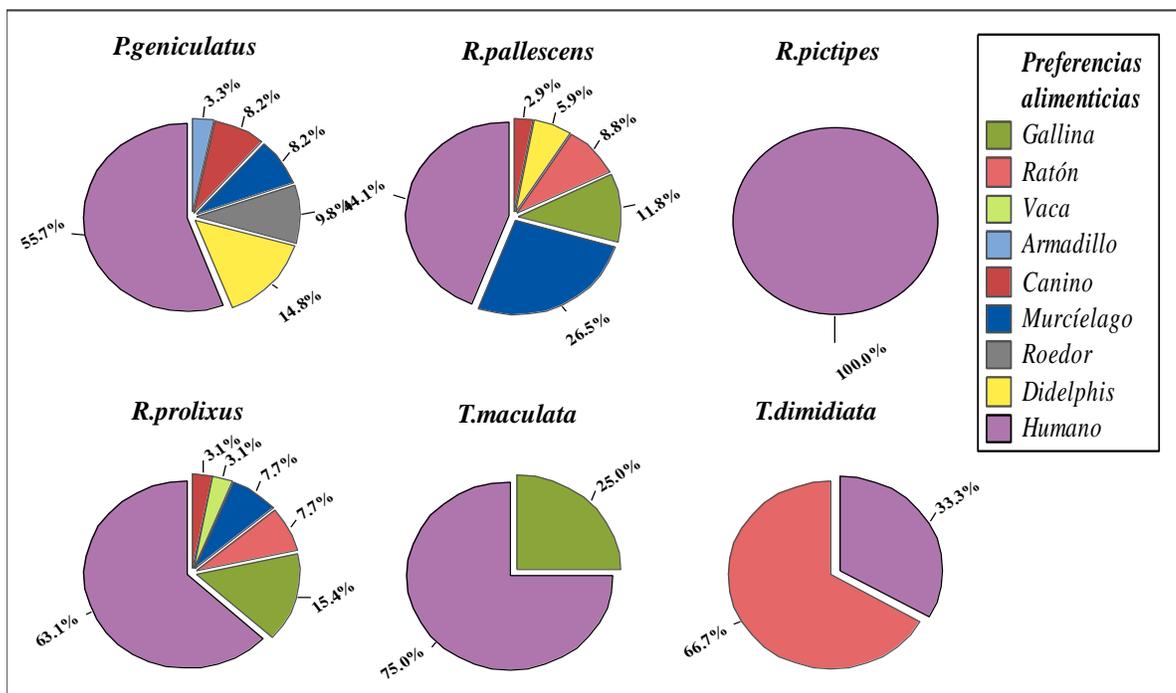


Figura 21. Frecuencia de preferencias alimenticias en cada una de las especies de Triatominos analizadas.

Para las fuentes de alimentación según los ciclos epidemiológicos: intra, peri y extra, las fuentes de alimentación de sangre humana, gallina, murciélago y *Didelphis marsupialis* (Figura 22) en las especies de *T. maculata* y *R. pallescens*. Adicionalmente, cabe resaltar las fuentes alimenticias de *T. maculata* fueron sangre humana y de gallina. En *R. prolixus* y

específicamente en los domiciliados las principales preferencias alimenticias fueron sangre humana y de gallina (Figura 23).

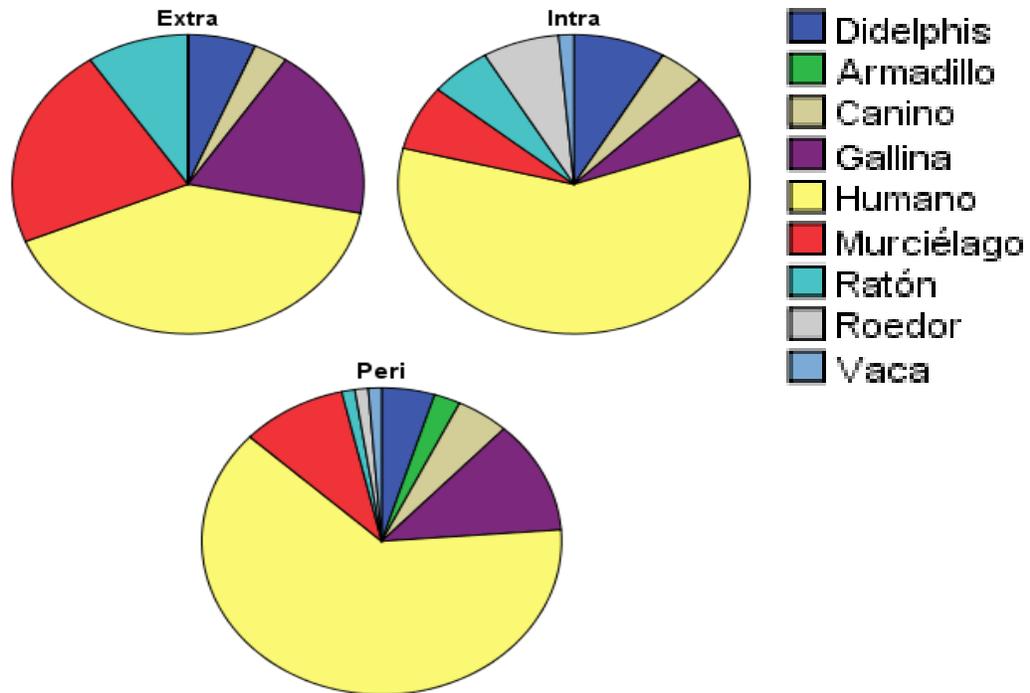


Figura 22. Preferencias alimenticias encontradas en los diferentes ecótopos de recolección de insectos triatominos.

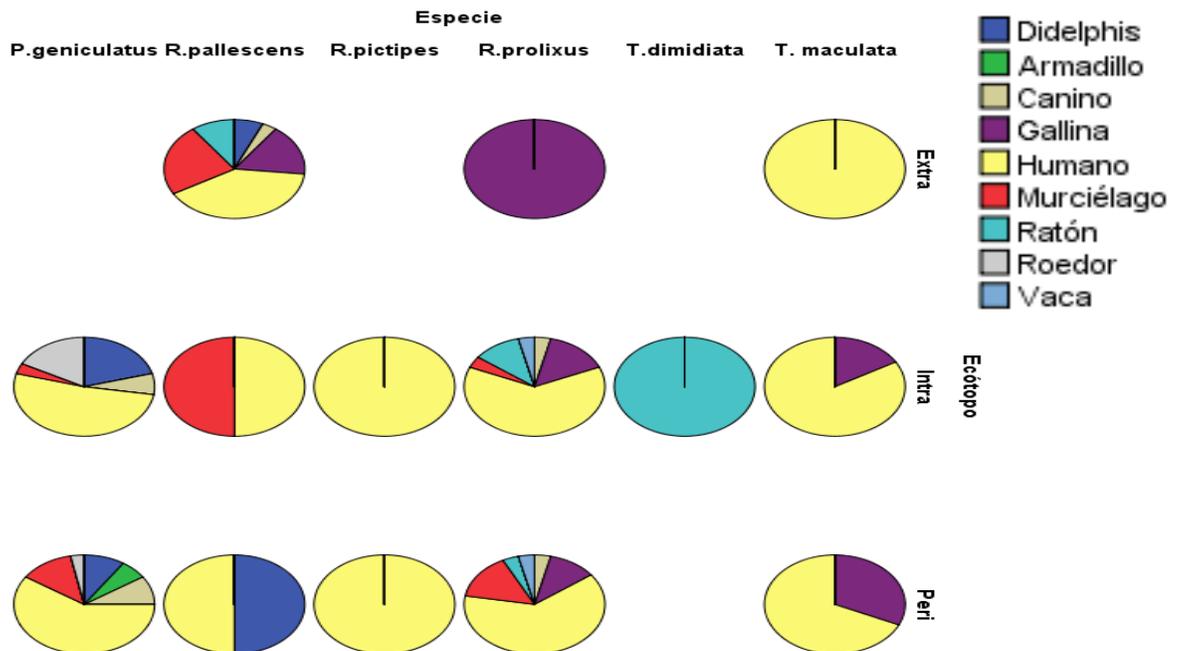


Figura 23. Preferencias alimenticias según especies encontradas y ecótopos. Se

clasificaron las preferencias en cada una de las 6 especies encontradas y a su vez en los 3 ecótopos de recolección.

Se estudiaron las preferencias alimenticias en los insectos que fueron positivos para *T. cruzi* (Figura 24) y específicamente aquellos que presentarían fuente de alimentación humana y positividad para *T. cruzi* de manera simultánea, encontrándose que las especies con mayor frecuencia de positividad por *T. cruzi* y alimentación con sangre humana, fueron *R. prolixus* (34.2%), *P. geniculatus* (31.9%) y *T. maculata* (22.2%) (Figura 25).

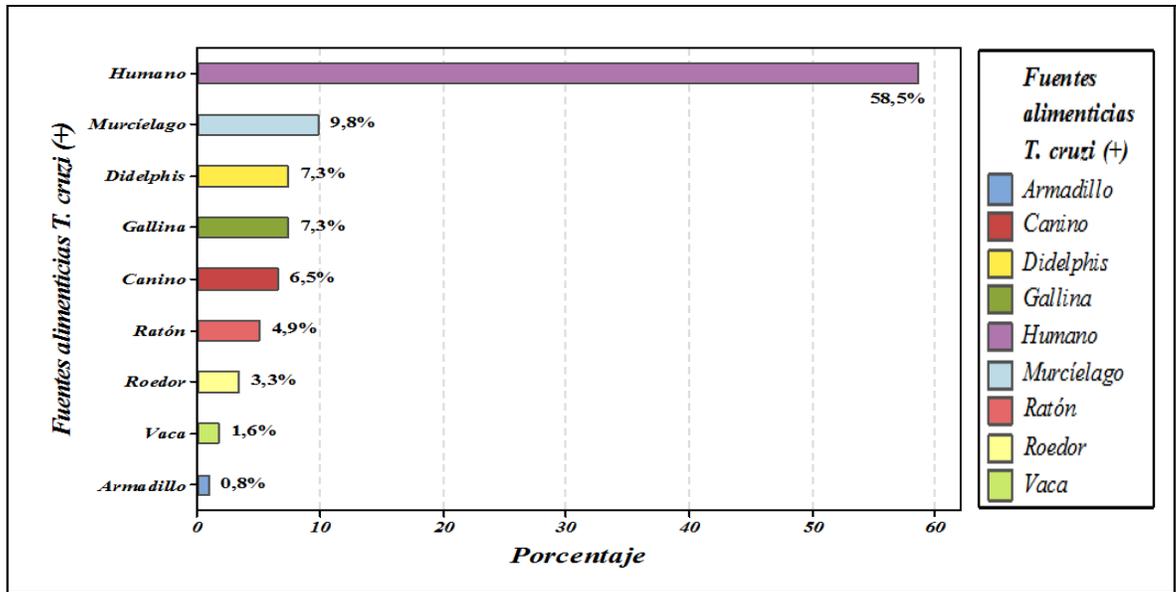


Figura 24. Fuentes alimenticias encontradas en insectos triatomínicos infectados con *T. cruzi*

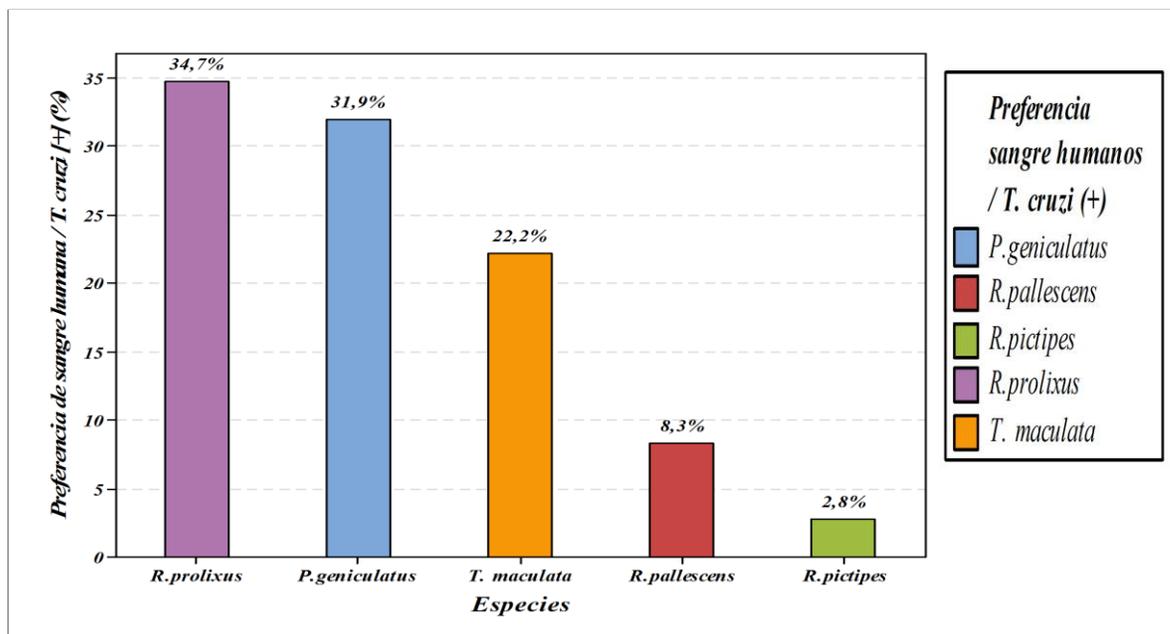


Figura 25. Frecuencia de especies de triatominos analizados infectados con *T. cruzi* y alimentados con sangre humana. Este análisis corresponde al total de triatominos infectados con *T. cruzi* y que se alimentaron con sangre humana simultáneamente (N=72)

Tabla 20. Frecuencias de positividad para *T. cruzi* y alimentación con sangre en cada una de las especies más representativas.

Especie	Positivos <i>T. cruzi</i>	Total	%Positivos <i>T. cruzi</i>	Sangre humana <i>T. cruzi</i> (%)
<i>T. maculata</i>	23	34	67.65	47.06
<i>P. geniculatus</i>	60	85	70.59	27.06
<i>R. pallescens</i>	17	37	45.95	16.22
<i>R. prolixus</i>	43	77	55.84	32.47

Finalmente, el análisis de regresión logística evidenció que la positividad de *T. cruzi* se relaciona con determinadas variables que se muestran a continuación en la (Tabla 21).

Tabla 21. Variables relacionadas con positividad para *T. cruzi* en insectos triatominos

Características	Positividad para <i>T.cruzi</i>		
	Odds Ratio	IC95 %	P- Value
Departamento			
<i>Guajira</i>	2.13	1,16-3,94	0.016
<i>Meta</i>	2.65	1,69-4,17	0.000
Especie			
<i>P.geniculatus</i>	2,40	1,51-3,82	0.000
<i>T.maculata</i>	2,09	1,02-4,29	0.044
Ecótopo			
<i>Peridomicilio</i>	2.52	1,61-3,93	0.000
Estadio			
<i>Hembra</i>	2.05	1,39-3,04	0.000
Preferencia Alimentaria			
<i>Didelphis</i>	3.15	1,85-11,69	0.047
<i>Humano</i>	1.55	1,07-2,24	0.022

- **Distribución de DTUs de *T. cruzi* de diferentes especies de triatominos**

Se realizó detección de las DTUs y genotipos de TcI, en las 150 muestras que fueron positivas para *T. cruzi* y se analizó su distribución de acuerdo a las especies y ecótopos. Se encontraron casos de infección por una única DTU y algunos insectos con infecciones mixtas, la distribución de las DTUs en los insectos positivos para *T. cruzi*, se observa en la (Tabla 22).

Tabla 22. DTUs de *T. cruzi* encontradas en insectos triatominos analizados

<i>DTUs</i>	<i>N</i>	<i>% Positividad</i>	<i>IC (95%)</i>
TcI	101	67.30	60.2-75.3
TcIII	13	8.70	4.2-13.2
TcII	10	6.70	2.7-10.7
TcV	9	6.00	2.2-9.8
TcIV	6	4.00	0.8-7.2
TcI/TcII	2	1.30	0.2-4.7
TcI/TcIII	2	1.30	0.2-4.7
TcI/TcIV	2	1.30	0.2-4.7
TcI/TcV	2	1.30	0.2-4.7
TcI-TcII	1	0.70	0.02-3.7
TcI/TcIII/TcIV	1	0.70	0.02-3.7

Se obtuvo la distribución de las DTUs (TcI-TcVI) en cada una de las especies de triatominos y ecótopos, encontrándose principalmente las DTUs TcI y TcIII (Figura 26). Para el caso de TcI se analizó la distribución de los genotipos TcI Selvático y TcI Doméstico (Figura 27).

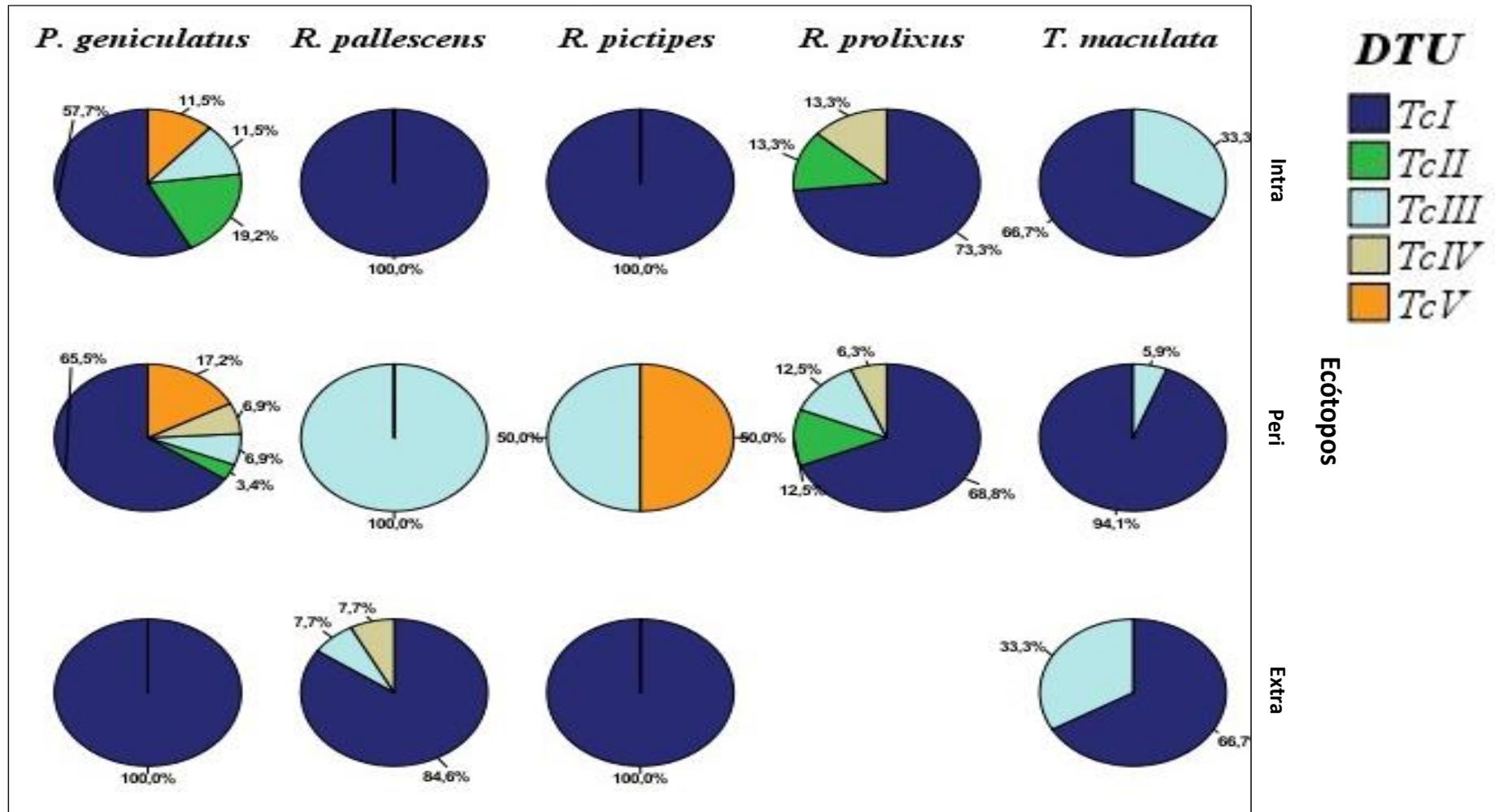


Figura 26. Distribución de DTUs de *T. cruzi* según especies recolectadas y ecótopos.

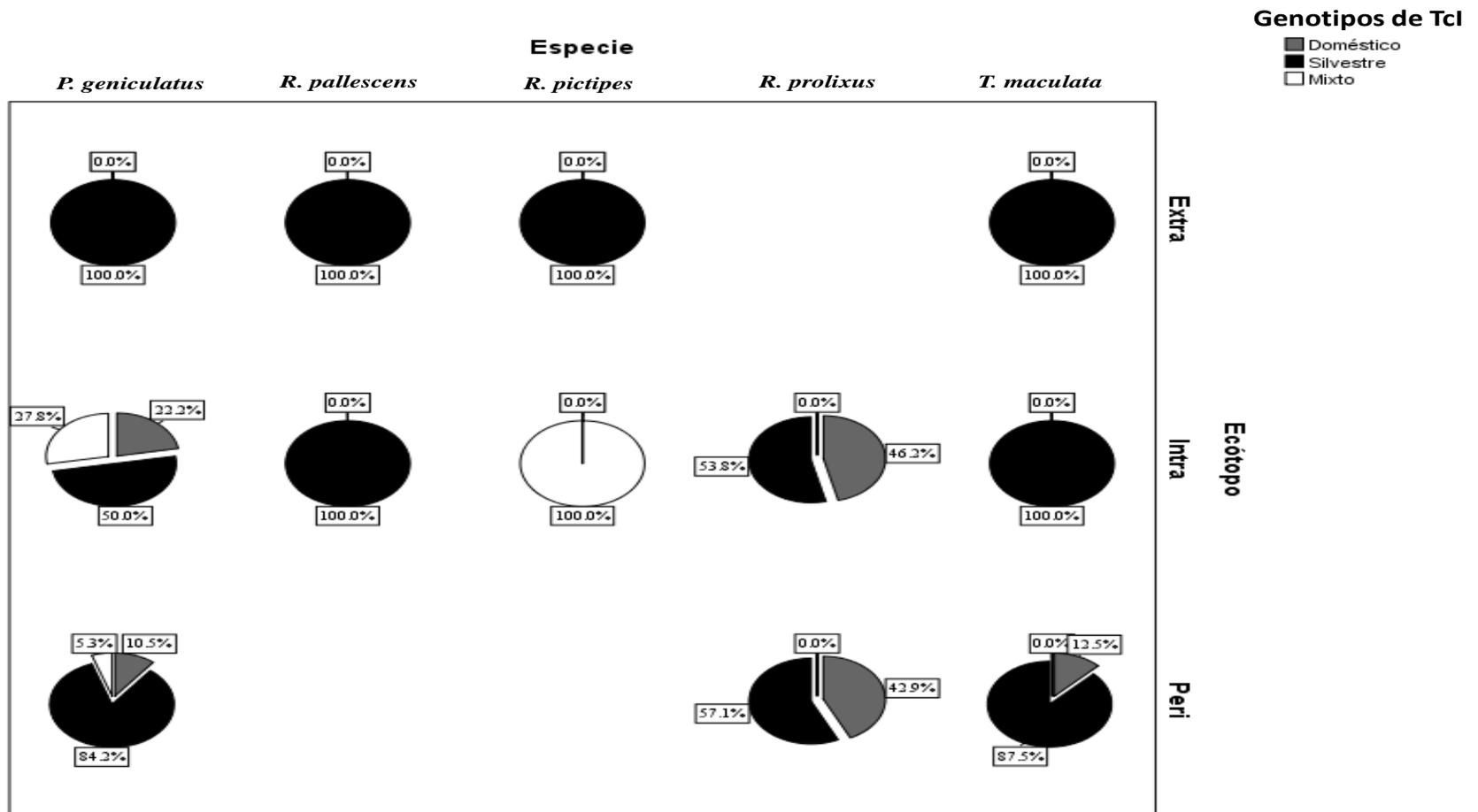


Figura 27. Distribución de genotipos de *T. cruzi* según especies recolectadas y ecótopos. Doméstico: TcI Doméstico, Silvestre: TcI Selvático y Mixto: infección simultánea de los dos genotipos (TcI Doméstico/TcI Selvático).

5.1.3.3 Discusión

- Análisis general en todos los insectos recolectados

La mayoría de los triatomíneos recolectados en este estudio, son considerados vectores secundarios. Sin embargo, fueron recolectados principalmente en ecótopos domésticos (peridomicilio y domicilio), al igual que en *R. prolixus* y *T. dimidiata* considerados triatomíneos domiciliados (Figura 18). La principal fuente alimenticia en el total de insectos fue la sangre humana, seguida de animales domésticos y en menor proporción de animales silvestres (Figura 20). Adicionalmente, al observar las fuentes alimenticias por ecótopos se observa que en los insectos recolectados en el intradomicilio y peridomicilio se encuentran fuentes alimenticias de humanos, mamíferos domésticos y de hábitats selváticos. Estos hallazgos son de gran importancia dado que permiten deducir la intrusión de los vectores desde ecótopos silvestres hacia los hábitats domésticos tanto por su ecótopos durante la recolección, como por sus fuentes alimenticias.

Adicionalmente, la positividad de *T. cruzi* en los triatomíneos recolectados fue de 61.2% (150/245), de los cuales en su mayoría corresponden a las especies *P. geniculatus*, *R. prolixus* y *T. maculata* (Figura 19). El análisis de regresión logística permitió observar la relación de la positividad a *T. cruzi* con los vectores secundarios *P. geniculatus* y *T. maculata*, el ecótopo peridomiciliario, estadio hembra y las preferencias alimenticias de sangre de *D. marsupiales* y humanos (Tabla 21). Principalmente se detectaron DTUs (TcI y TcIII) y específicamente el genotipo TcI Selvático (Tabla 22 y Figura 27). Dentro de los insectos cuya fuente de alimentación fue sangre humana y simultáneamente se encontró la presencia del parásito, las que mayor frecuencia presentaron fueron *R. prolixus*, *P. geniculatus* y *T. maculata* (Figura 25).

Los hallazgos descritos evidencian la importancia de nuevos ciclos de transmisión de *T. cruzi* causados por intrusión de vectores secundarios infectados con el parásito desde ecótopos selváticos a los hábitats domésticos y es de gran importancia dado que la positividad de *T. cruzi* se encontró asociada con alimentación con sangre humana, indicando que posiblemente ocurrió transmisión a humanos por estos vectores especialmente por *P. geniculatus* y *T. maculata*. Adicionalmente, se reafirma el papel de *R. prolixus* como vector principal en Colombia, ya que entre las especies de triatomíneos recolectadas en este estudio, *R. prolixus* presentó la mayor frecuencia de alimentación con sangre humana e infección con *T. cruzi* de manera simultánea (32.47%) y adicionalmente el 98.4% de los ejemplares de esta especie fueron recolectados en hábitats domiciliados.

La presencia de DTUs de ciclos silvestres en hábitats domésticos y peridomésticos confirma lo anterior, al igual que la asociación de infección por *T. cruzi* y la fuente de alimentación con *D. marsupialis*, que se encontró presente en los ecótopos intradomiciliario y peridomiciliario, reafirmando el ya descrito potencial de este mamífero como un importante reservorio del parásito ya que actúa como puente de transmisión desde hábitats silvestres hacia hábitats domésticos (276,277).

Estos resultados refuerzan otros estudios en Colombia, que evidencian que los vectores considerados como secundarios juegan un papel muy importante en los diferentes ciclos epidemiológicos de transmisión de *T. cruzi*, incluso demostrando que la frecuencia de pacientes con serología positiva en presencia de vectores silvestres, es similar a la frecuencia presente en presencia de vectores domiciliados (62,278).

Todos estos aspectos deben ser tenidos en cuenta por los programas de control vectorial en el país, teniendo en cuenta que este estudio cuenta con insectos recolectados en 7 departamentos. En definitiva, se evidencia el potencial riesgo de transmisión de *T. cruzi* por vectores considerados como secundarios, que muestran una intrusión gradual en el domicilio, por lo tanto, se requiere el diseño de estrategias de vigilancia y control de vectores silvestres en el país considerando adicionalmente su potencial vectorial en los ciclos de transmisión oral del parásito.

- ***Análisis de vectores silvestres***

A continuación, se analiza con mayor detalle las especies silvestres con mayor número de ejemplares recolectados y cuyos resultados son de importancia en salud pública.

• ***Triatoma maculata***

T. maculata es una de las especies con mayor distribución geográfica en Colombia, en este estudio los ejemplares fueron recolectados principalmente en la Guajira. Se logró la recolección en todos los ecótopos, evidenciando una alta invasión de hábitats peridomiciliados (69.7%) e intradomiciliados (21.2%), se encontró asociado con los gallineros, áreas de descanso de mascotas, alcobas y cocina. En el intradomicilio se encontraron ninfas y adultos. Estos aspectos son de gran importancia dado que evidencian la colonización y movilidad de este vector a los hábitats peridomésticos y domésticos, lo que concuerda con otros estudios en Colombia, Brasil y Venezuela, en los que incluso se han encontrado cambios morfológicos y genéticos en los insectos recolectados en los ambientes domésticos, evidenciando un posible proceso de adaptación y el alto riesgo de transmisión del parásito por *T. maculata* (277–281).

Se encontró que la positividad de infección por *T. cruzi* fue del 67.5% y las fuentes de alimentación fueron sangre humana (75.0%) y sangre de gallina (25.0%). Este vector ocupó el tercer lugar de positividad para infección por *T. cruzi* y sangre humana al tiempo (Figura 25). *T. maculata*, no ha sido considerado como vector de alto riesgo para transmisión de *T. cruzi*, dado que se ha reportado que su preferencia alimenticia es principalmente ornitofilia (279,282–284) y algunos estudios previos al 2000, reportaron bajas frecuencias de infección triatomínica en *T. maculata*, recolectados en Brasil y Venezuela (283,285). Posterior a esta fecha, se han realizado estudios en Colombia y Venezuela, en los que los índices de infección con *T. cruzi* son mucho mayores oscilan entre 38.0% y 75.0%, en concordancia con lo que se encontró en este estudio (277,278,280,281,275,286).

En esta especie se encontraron las DTUs TcI y TcIII y principalmente el genotipo TcI Selvático, que son asociadas con ciclos silvestres. Aunque en algunos casos de insectos recolectados en el peridomicilio se encontró el genotipo TcI Doméstico. Todos estos hallazgos resaltan la relevancia de *T. maculata* como un potencial vector y su alimentación con sangre humana e infección con el parásito resaltan que debe ser tenido en cuenta en los programas de control vectorial y adicionalmente el potencial riesgo de domiciliación que eventualmente puede presentar en los sitios donde se encuentra.

- ***Panstrongylus geniculatus***

Panstrongylus geniculatus es la especie del genero *Panstrongylus* con mayor distribución en América latina (287). En Colombia también presenta una alta distribución geográfica, ha sido encontrado en 25 departamentos del país, entre ellos el departamento del Meta de donde provienen los ejemplares de este estudio y se realizó el primer registro de *P.geniculatus* (62).

En este estudio los ejemplares fueron recolectados principalmente en ecótopos domésticos (Intra:55.3% y Peri: 43.5%) a pesar que es considerado un vector silvestre principalmente asociado con madrigueras de armadillos, zarigüeyas, roedores y murciélagos (287). Sin embargo, existen varios reportes en América latina y Colombia de la intrusión de ejemplares adultos de *P. geniculatus* en hábitats domésticos (288–291) y también el hallazgo de diferentes estados ninfales en viviendas humanas, principalmente en Brasil, Venezuela y Colombia en Amalfi, Antioquia (292–296).

La presencia del insecto en hábitats domésticos, posiblemente se debe a que los municipios del departamento del Meta en los que se realizó la recolección, recientemente han sido sometidos a procesos de urbanización, alterando los bosques primarios y por ende los insectos buscan fuentes de alimentación en las viviendas humanas y adicionalmente pueden ser atraídos por la luz artificial de las viviendas (61,297).

De todos los insectos analizados, *P. geniculatus* ocupó el primer lugar en infección por *T. cruzi* (Figura 19). El 70.6% (60/85) de los ejemplares de *P. geniculatus* recolectados fueron positivos para *T. cruzi*, este porcentaje es similar a los reportados previamente en Brasil, Venezuela y Colombia (286,292,294,295).

En cuanto a las preferencias alimenticias, se observó una amplia variedad de fuentes de alimentación, evidenciándose la gran capacidad adaptativa de esta especie y explicando el alto porcentaje de infección con el parásito (Figura 20). Es de gran importancia que el 63.9% de los insectos se alimentaron de sangre humana y de caninos, estos hallazgos corresponden a trabajos descritos previamente en los que se han encontrado altos porcentajes de alimentación con sangre humana y animales peridomésticos (294,295)

Adicionalmente de todos los insectos analizados, *P. geniculatus* ocupó el segundo lugar en infección con *T. cruzi* y alimentación con sangre humana simultáneamente (Figura 25), que

corresponden al 27.0% (23/85) de los ejemplares analizados de esta especie. Esto es de gran importancia ya que refleja que está ocurriendo infestación de los hábitats domésticos con el insecto. El valor de infección con *T. cruzi* y alimentación con sangre humana encontrado en Colombia es inferior al observado en Venezuela (293–295). En Venezuela, adicionalmente se han presentado 10 brotes orales y en todos se ha encontrado incriminado principalmente *P. geniculatus*, dado que esta especie ha mostrado que es la que mejor se ha adaptado a ecótopos domiciliados, reforzando lo observado en este estudio (298).

El 36.1% de los ejemplares de *P. geniculatus*, se alimentó de fuentes silvestres (zarigüeyas, roedores, murciélagos y armadillos) reafirmando la relación que existe entre esta especie y los hábitats silvestres específicamente madrigueras de roedores, zarigüeyas, armadillos y cuevas de murciélagos (61,287,299).

Los resultados descritos resaltan que eventualmente *P. geniculatus* actúa como un puente que permite la circulación del parásito entre los hábitats silvestres y domésticos, convirtiéndose en un vector con fuerte potencial de transmitir la infección del ciclo silvestre al humano por intrusión a las viviendas o mediante un proceso de adaptación a los hábitats domésticos, sin embargo, cabe rescatar que todos los ejemplares recolectados corresponden a estadios adultos. La colonización en los hábitats domésticos puede deberse a los cambios generados por la construcción de viviendas y alteración del ecosistema en los municipios analizados y/o por la atracción generada por la luz artificial (297).

En los ejemplares de *P. geniculatus* se encontraron 5 DTUs TcI a TcV (Figura 26), en Colombia se ha reportado previamente la presencia de las DTUs TcI a TcIV (47,297) y existen otros reportes de las DTUs TcI, TcIII y TcIV en diferentes ejemplares recolectados en Brasil y Venezuela (292,294). La presencia de 5 de 6 DTUs en esta especie puede asociarse con la gran variedad de fuentes de alimentación lo que aumenta la exposición de los insectos a los diferentes genotipos del parásito.

Para el caso de la DTU TcII, esta DTU se ha descrito en murciélagos y didélfidos en ambientes silvestres (44,47,250) y para el caso de la DTU TcV, esta DTU se ha descrito principalmente asociado con ciclo doméstico de transmisión, armadillos y roedores (43,47).

En el 100.0% de los ejemplares positivos para *T. cruzi* recolectados en el hábitat silvestre se detectó el genotipo TcI Selvático, mientras que la frecuencia de este genotipo disminuyó a un 84.2% en los insectos recolectados en el peridomicilio y a un 50% en los insectos recolectados en el domicilio. Este hallazgo, sumado a las fuentes de alimentación encontradas, recolección de estadios adultos en el domicilio y los procesos de urbanización en los municipios de recolección, permiten evidenciar que el proceso es de intrusión, pero a su vez evidencia un eventual proceso de adaptación al domicilio o proceso de domesticación, que debe ser tenido en cuenta dado que existe evidencia de estos procesos en Colombia, Venezuela y Brasil (288–291), incluso acompañado de cambios morfológicos en los insectos (271,300) y dejan en relieve el potencial de esta especie para realizar un proceso de domiciliación.

En Colombia, es una necesidad que se diseñen estrategias de control para vectores como *P.geniculatus*, no solo para evitar la elevada letalidad por brotes de transmisión oral, en los que esta especie ha sido ampliamente incriminada, sino también para evitar que eventualmente estos insectos puedan realizar un proceso de domiciliación en el país (28,76).

- ***Rhodnius pallescens***

R. pallescens se ha descrito principalmente en Panamá, Costa Rica, Nicaragua y Colombia (278,286,301–305). En este trabajo, los insectos fueron recolectados en los departamentos de Antioquia y Cesar. Sin embargo, ejemplares de esta especie han sido recolectados en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Magdalena, Bolívar, Sucre, Norte de Santander y Santander (62,278,286,305–308).

R. pallescens se considera una especie selvática, dado que se ha visto que su hábitat son las palmas, principalmente la palma de vino *Attalea butyracea* y la invasión en ecótopos domésticos se da mediante intrusiones (61,302,305,306,308). Sin embargo, en Panamá se considera el principal vector e incluso se han recolectado estados ninfales en el domicilio (302,303,309).

En este estudio se encontraron insectos en los tres ecótopos (doméstico, peridoméstico y silvestre), la mayoría de ejemplares tanto ninfas como adultos fueron recolectados en ecótopos silvestres, principalmente en palmas de vino y de aceite, mientras que el 21.6% (solo adultos) fueron recolectados en hábitats domésticos, esto en concordancia con estudios previos en Colombia (278,305–308).

El porcentaje de infección por *T. cruzi* fue de 45.9%. En Colombia, se han reportado porcentajes de infección con el parásito del 23.8 al 90.0% en la costa caribe (286,305), valores similares se han observado en Panamá (32.0% al 90.0%) (304,309,310). Estos hallazgos son de importancia ya que en los municipios de recolección de este estudio, las palmas se encuentran cercanas a las viviendas, incrementando el riesgo de intrusiones y facilitando el acceso de los insectos a los hábitats domésticos y por ende generar infección con el parásito, por contacto humano con heces del insecto o por contaminación de alimentos en las viviendas y provocando brotes de transmisión oral, en Colombia *R. pallescens* se ha encontrado presente en dos lugares en los que se presentaron brotes de posible transmisión oral (28,73,76).

En este estudio, se observó que la principal fuente de alimentación de *R. pallescens* fue la sangre humana 44.1%, en los 3 ecótopos se observó como fuente de alimentación preferencial, incluso se recolectaron ninfas en el extradomicilio que se alimentaron de sangre humana. Esto posiblemente, se debe a que en los sitios de recolección de los insectos una de las principales actividades económicas es la agricultura, adicionalmente se cuenta con palmas de vino cercanas a las viviendas, lo que puede facilitar el contacto del vector con hospederos humanos. Se ha observado el mismo comportamiento en Panamá, la presencia de sangre

humana en ninfas del extradomicilio también se ha explicado mediante un proceso conocido como ‘kleptohemodeipnonism’ mediante el cual las ninfas se alimentan de manera secundaria de adultos que se han alimentado previamente (302).

En este estudio, también se observó alimentación con diferentes mamíferos, como *D. marsupialis* en el peridomicilio y murciélagos, ratones y caninos, en el extradomicilio. Esto se debe a que es común la presencia de zarigüeyas o animales sinantrópicos en las palmas ubicadas en peridomicilio y extradomicilio, los mamíferos viven en la capa arbórea de la corona de las palmas de vino, facilitando que los insectos puedan alimentarse de una amplia variedad de mamíferos y también de aves y reptiles, resultados similares han sido observados en *R.pallescens* recolectados en Panamá (302–304,309–311).

Finalmente, en el intradomicilio se detectó únicamente TcI selvático, mostrando que los ejemplares de *R. pallescens* corresponden a intrusiones en las viviendas desde el hábitat extradoméstico. Sin embargo, contrario a lo encontrado, Cantillo et al., 2010 (305), detectó TcIb en ejemplares de *R. pallescens* recolectados en hábitats domésticos, confirmando así que en Colombia debe tenerse en cuenta que existe riesgo de infección por *R.pallescens* y la alta presencia de alimentación con sangre humana e infección con *T. cruzi*, resalta que deben tomarse acciones de control y vigilancia dirigidas hacia esta especie.

5.1.4 Diagnóstico y epidemiología molecular de *T. cruzi* para análisis de dinámica de transmisión en brotes de posible transmisión oral

5.1.4.1 Metodología

- Población de estudio

Se incluyeron 70 pacientes con sospecha de infección por *T. cruzi* de posible transmisión oral, 39 muestras de reservorios y 23 muestras de triatominos, en el marco de dos brotes que se presentaron en el año 2014. Los brotes de posible transmisión oral se presentaron en el municipio de Cumaral, Meta y Paz de Ariporo, Casanare (Figura 28).

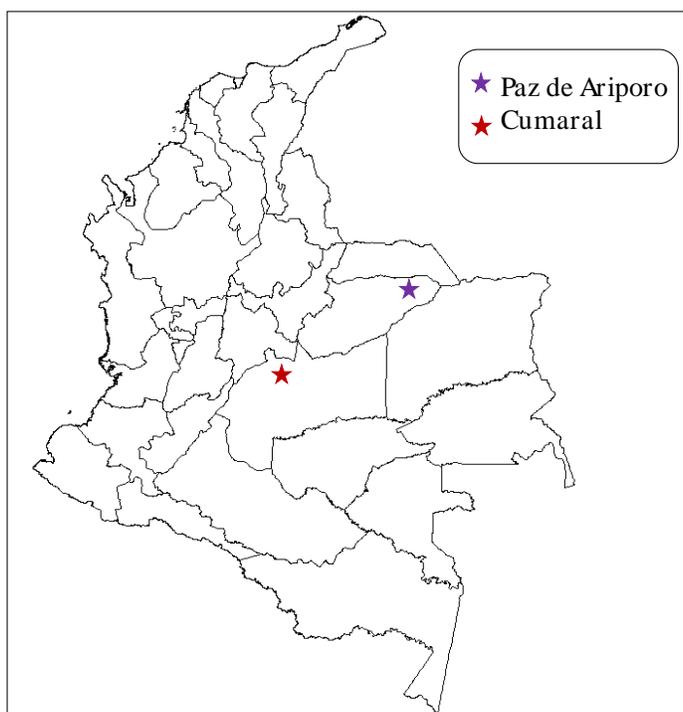


Figura 28. Localización geográfica de municipios en los que se presentaron brotes, Paz de Ariporo, Casanare y Cumaral, Meta.

- Estudio epidemiológico

Luego de la confirmación de casos índice en cada uno de los brotes, la cual se realizó mediante la observación del parásito en gota gruesa. Diferentes grupos de epidemiólogos realizaron la investigación correspondiente acerca de los alimentos consumidos y sitios de probable exposición a los vectores y reservorios, mediante entrevistas exhaustivas a los pacientes confirmados. Posteriormente, realizaron investigación epidemiológica en campo para identificación de casos probables mediante búsqueda activa institucional, que posteriormente fueron sometidos a pruebas de laboratorio para ser confirmados. En el marco de la investigación de campo, en los sitios involucrados en los brotes se recolectaron muestras de triatomíneos y de reservorios.

- Pruebas de laboratorio

En todos los pacientes realizaron las pruebas moleculares: qPCR para detección de *T. cruzi*, cPCR de kDNA para diferenciación de *T. cruzi/T.rangeli* y amplificación de blancos para genotipificación según el algoritmo descrito previamente (Figura 7) y pruebas serológicas (ELISA-IFI-HAI) según lo descrito previamente en el punto 5.1.1.1.

Se realizaron pruebas parasitológicas directas, Gota Gruesa y Hemocultivo, siguiendo los protocolos estandarizados en el grupo de parasitología del INS y se realizó la prueba de Tesa-Blot utilizando el Kit TESA-cruzi (bioMérieux Brasil S.A.).

En los pacientes del brote de Casanare, se realizó evaluación post tratamiento mediante pruebas de laboratorio (Serología y qPCR) un año después de recibido el tratamiento etiológico.

- **Análisis de Microsatélites**

En todas las muestras y aislamientos con diagnóstico molecular positivo para *T. cruzi*, se realizó la amplificación de siete marcadores microsatélites mediante PCR utilizando los iniciadores reportados por Valadares et al., 2008 y Duque et al., 2011 y marcados con el fluoróforo FAM (122,123). Para obtener los productos alélicos de los siete marcadores analizados, se utilizó un secuenciador capilar automatizado y se determinó el peso molecular mediante comparación con un marcador de peso molecular. Posteriormente, se calcularon las distancias genéticas mediante el software MICROSAT y se construyó un árbol de distancias utilizando el método de vecinos cercanos (Neighbour-Joining).

5.1.4.2 Resultados

- **Descripción de los brotes.**

▪ **Brote Cumaral, Meta:**

Los casos confirmados pertenecen a una familia de 5 integrantes (4 adultos y 1 menor de edad) que residen en la ciudad de Bogotá y se desplazan a una finca en el municipio de Cumaral, Meta, en la que residen del 13 al 16 de febrero de 2014. Durante los días de su estadía, la familia usualmente no cocina en la finca, el agua y otros alimentos son llevados desde Bogotá y por lo general se desplazan a comer en restaurantes de la zona al municipio de Cumaral. En la finca permanecen empleados y la familia del mayordomo que reside de manera permanente, pero no consumen los mismos alimentos de la familia en la que se presentan casos.

Posterior a la fecha de exposición, el 25 de febrero una de las integrantes de la familia presenta sintomatología compatible con un cuadro agudo de enfermedad de Chagas (Fiebre y hepatomegalia), por lo cual es hospitalizada y dos días después 3 integrantes más, son hospitalizados por presencia de síntomas. Durante el periodo de hospitalización se estudian los síntomas sin éxito y el día 7 de marzo se detecta el primer caso mediante análisis de gota gruesa en el INS y la posterior confirmación de los 3 casos adicionales sintomáticos (adultos). Se realiza diagnóstico al menor de 5 años, que se encuentra asintomático y se descarta la presencia del parásito.

Durante la investigación en los pacientes confirmados, se estudió si reconocían los vectores o si fueron picados por ellos durante su niñez, encontrándose que ninguno de los pacientes reconoce haber estado expuesto a los insectos. Adicionalmente, ninguno de los pacientes

había recibido transfusiones sanguíneas, tenían antecedentes de trasplantes, ni antecedentes de familiares con enfermedad de Chagas. También, se investigó acerca de los alimentos consumidos por los 4 adultos, que no hubiesen sido consumidos por el menor (no infectado), y se involucraron alimentos consumidos en la finca y en restaurantes cercanos. Se inicia la investigación de campo mediante la visita de sitios involucrados en el brote (Finca, fincas cercanas y restaurantes de Cumaral) **Figura 29.**

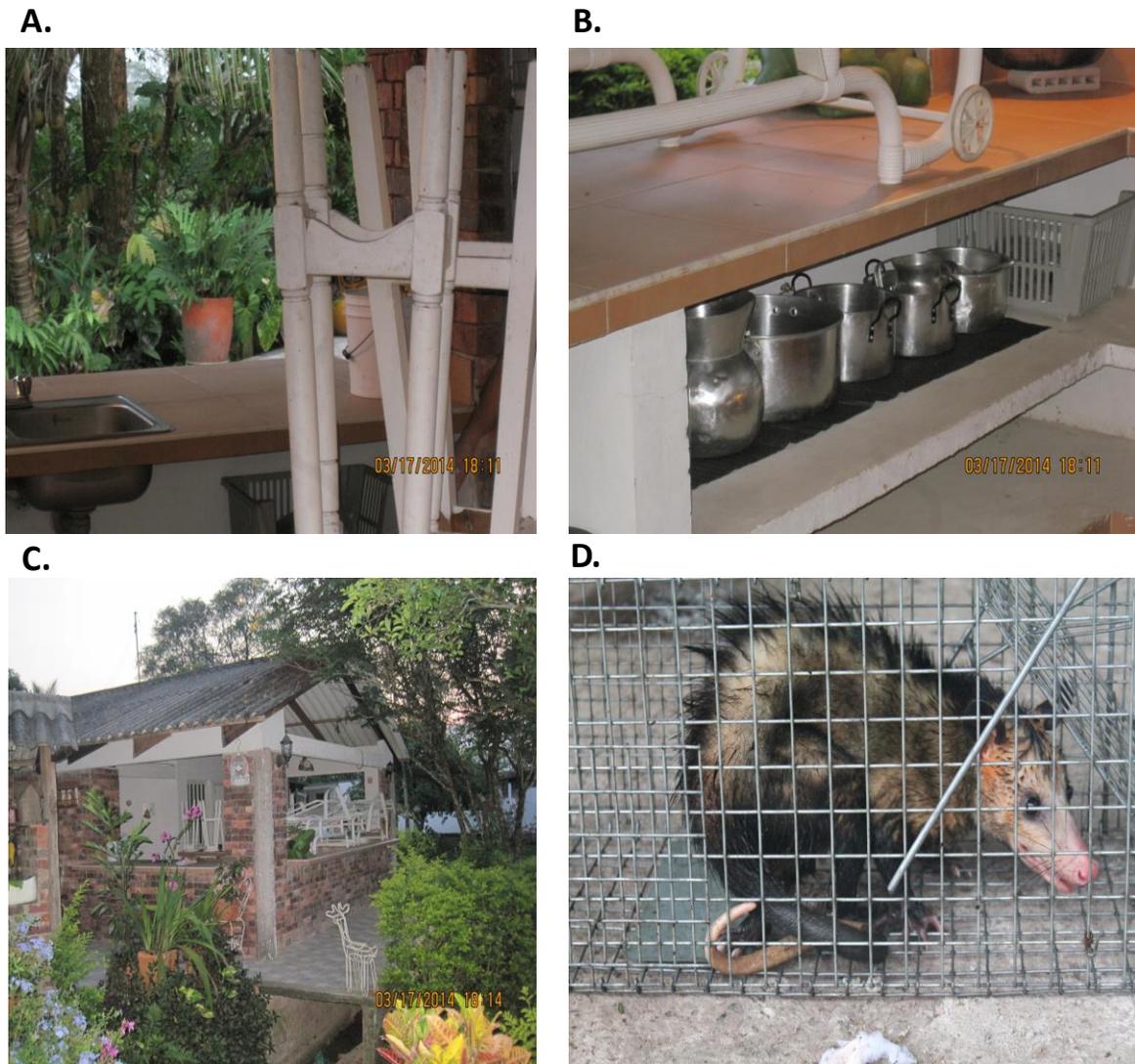


Figura 29. Imágenes de la finca índice en brote de Cumaral, Meta. **A.** Imagen de la cocina abierta al aire libre **B.** Imagen de recipientes para preparación de alimentos expuestos al aire libre **C.** Vista de la cocina y su ambiente libre permitiendo así, la intrusión de triatominos fácilmente y su eventual contacto con alimentos **D.** Zarigüeya capturada en transecta a 300 metros de la finca índice.

En la investigación de campo se toman muestras a los trabajadores de la finca y se realiza un recorrido por los restaurantes, en los que se realiza una encuesta para detectar casos probables a los que se toman muestras, en la finca se recolectaron 17 insectos y se distribuyeron 28 trampas en transectas hasta 300 metros alrededor de la finca índice, durante 3 días (Tabla 23).

▪ **Brote Paz de Ariporo, Casanare.**

Los casos confirmados corresponden a trabajadores de 10 empresas petroleras, quienes laboraban en el pozo que se encuentra aproximadamente a 6 horas del casco urbano del municipio de Paz de Ariporo, durante el periodo comprendido entre 15 de febrero y 30 de marzo de 2014. Aproximadamente, 551 personas circularon en este pozo durante este periodo de tiempo, la mayoría de ellas, se encontraban distribuidas en diferentes zonas del país.

El día 2 de abril se realiza la detección del primer caso confirmado, el cual presentaba un cuadro febril mayor a 20 días y fue positivo mediante gota gruesa y pruebas serológicas, el paciente manifestó que el último mes había trabajado en el pozo petrolero. En ese momento se alertan las 10 empresas petroleras y se inicia la investigación epidemiológica mediante búsqueda activa institucional y búsqueda activa comunitaria. De esta manera se detectaron 54 casos probables y 36 casos confirmados incluido un paciente fallecido (En este paciente el diagnóstico fue realizado mediante detección de ADN de *T. cruzi* en tejido cardiaco de biopsia postmortem).

En el trabajo de campo se investigaron el restaurante y el hotel del pozo, así como las fuentes de alimentación e hidratación, de los casos confirmados. Adicionalmente, se instalaron 22 trampas Tomahawk cerca a los sitios índices y se recolectaron insectos triatominos (Figura 30 y Tabla 23).

A.



B.



C.



D.



E.



F.



Figura 30. Imágenes de hotel y restaurante ubicado en pozo petrolero de caño chiquito en Paz de Ariporo. A. Se observa sitio de preparación de alimentos que ocurre en un ambiente completamente abierto **B.** Se observa la presencia de un reservorio canino cerca al sitio de almacenamiento de bebidas y alimentos **C.** Zarigüeya en un árbol cercano hotel y restaurante **D.** Cocina y sitio de almacenamiento de alimentos del restaurante **E.** Zarigüeya capturada en trampa instaurada alrededor del restaurante **F.** Búsqueda de insectos triatominos en habitaciones del hotel, donde fueron encontrados debajo de los colchones de las camas.

Tabla 23. Muestras recolectadas en cada uno de los brotes de posible transmisión oral

Brote	Casos sintomáticos	Casos probables	Reservorios	Insectos
Cumaral	4	15	32	20
Paz de ariporo	36(31)*	54(20)**	7	3
Total	40	69	39	23

*De los 36 casos, se lograron obtener muestras en 29 casos para análisis en el INS y 2 resultados de serología del departamento de Casanare. Los 5 casos restantes, fueron evaluados en otras ciudades y no se cuenta con resultados.

**De los 54 casos probables, 20 fueron analizados en el INS y 34 en laboratorio de salud pública de Casanare.

- Diagnóstico molecular de muestras recolectadas en brotes de posible transmisión Oral

En el brote de Cumaral, se recolectaron 32 reservorios, 3 Zarigüeyas (*D. marsupialis*) y 29 caninos. En las 3 zarigüeyas, la qPCR fue positiva en los dos tipos de muestras recolectadas (sangre y muestras de secreción de glándulas odoríferas). La qPCR fue positiva en el 27.5% (8/29) de los caninos analizados. Los insectos triatominos que fueron recolectados en la finca índice fueron identificados como *R. pictipes* (3/20) y *P. geniculatus* (17/20). En el Brote de Paz de Ariporo, se recolectaron 7 reservorios, 2 Zarigüeyas y 5 caninos, que se encontraron todos positivos mediante qPCR. Se recolectaron 3 ejemplares adultos de *R. prolixus* (Tabla 24).

Tabla 24. Resultados obtenidos en muestras recolectadas en los brotes mediante técnicas de diagnóstico serológicas, parasitológicas y moleculares.

Brote	Pruebas de diagnóstico	Casos sintomáticos	Casos probables	Reservorios	Insectos
Brote Cumaral	Gota Gruesa	2/4 (50.0%)	0/15 (0.0%)	NA	3/20 (15.0%)
	Serología	4/4 (100.0%)	0/15 (0.0%)	2/29 (7.0%)	NA
	qPCR	4/4 (100.0%)	0/15 (0.0%)	11/29 (37.9%)	17/20 (85.0%)
	Hemocultivo	4/4 (100.0%)	0/6 (0.0%)	3/5 (60.0%)	1/4 (25.0%)
	Tesa-Blot	4/4 (100.0%)	NA	NA	NA
Brote Paz de Ariporo	Gota gruesa	13/23 (56.5%)	54/54(0.0%)	NA	0/3 (0.0%)
	Serología	30/30 (100.0%)	54/54(0.0%)	3/5 (60.0%)	NA
	qPCR	26/29 (89.6%)	0/20(0.0%)	7/7 (100.0%)	2/3 (66.7%)
	Hemocultivo	3/9 (33.3%)	NA	2/2 (100.0%)	NA
	Tesa-Blot	14/14 (100.0%)	NA	NA	NA

NA: No se aplicó en determinada muestra

En cuanto a las cargas parasitarias en cada uno de los brotes, la mediana de la parasitemia en el brote de Paz de Ariporo fue de 7.2 equivalentes parásitos/mL (IC95%: 3.3-23.6) y en el brote de Cumaral fue de 6.2 equivalentes parásitos/mL (IC95%: 1.8-10.9) (Figura 31).

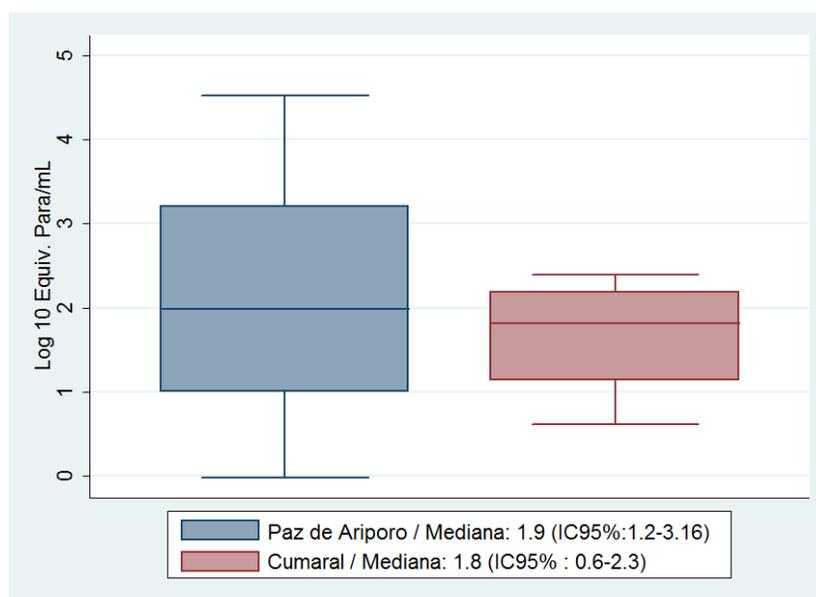


Figura 31. Cargas parasitarias en brotes de posible transmisión oral. Se muestran las cargas parasitarias en cada uno de los brotes.

Finalmente, la evaluación post-tratamiento etiológico del primer año en los pacientes del brote de Paz de Ariporo, evidenció negativización de qPCR en el 100% (29/29) de los pacientes, mientras que en las pruebas serológicas (ELISA, IFI, HAI) la negativización fue del 37.9% (11/29) de los pacientes infectados.

- **Distribución de DTUs en muestras recolectadas en brotes de posible transmisión Oral**

En cuanto a las DTUs observadas en los brotes, en general se observó principalmente, la presencia de DTUs y genotipos de TcI asociados con ciclos silvestres. La DTU con mayor frecuencia en los circuitos epidemiológicos de los dos Brotes fue TcI-Selvático, que para el brote de Cumaral presento una frecuencia de 73.3% y para el brote de Paz de Ariporo presento una frecuencia de 69.3% (Tablas 25 y Tabla 26).

Tabla 25. Frecuencias de DTUs detectadas en circuito epidemiológico de Brote de Cumaral.

Circuito epidemiológico	Positivos	DTU-Genotipo TcI	Frecuencia (%)
Pacientes	4	TcI-Selvático	100%
Insectos: <i>R. pictipes</i> (3) <i>P. geniculatus</i> (17)	16	TcI-Selvático	95.00%
	1	TcI-Selvático - TcIII	5.00%
Zarigueyas	1	TcI-Selvático	33.30%
	1	TcIV	33.30%
	1	TcI-Doméstico	33.30%
Caninos	4	TcI-Selvático	50.0 %
	2	TcIV	25.0%
	2	TcI-Selvático - TcIV	25.0%

Tabla 26. Frecuencias de DTUs detectadas en circuito epidemiológico de Brote de Paz de Ariporo.

Circuito epidemiológico	Positivos	DTU-Genotipo TcI	Frecuencia
Pacientes	28	TcI-Selvático	96.50%
	1	TcI-Doméstico	3.50%
Insectos: <i>R. prolixus</i>	3	TcI-Doméstico	100.00%
Zarigueyas	1	TcI-Selvático	50.00%
	1	TcIV	50.00%
Caninos	3	TcI-Selvático	60.00%
	1	TcI-Doméstico	20.00%
	1	TcIII	20.00%

- **Análisis de microsatélites de *T. cruzi* en brotes de posible transmisión oral**

En 96 muestras se logró la amplificación de los 7 loci a estudiar en las muestras positivas de los dos brotes, se encontraron 19 alelos en los 7 loci analizados. Los dos loci que presentaron mayor variabilidad fueron AAAT6 y TAT20, cada uno con 4 alelos diferentes. (Tabla 27). Se encontraron 10 alelos homocigotos y 9 heterocigotos en los 7 loci analizados.

Tabla 27. Alelos detectados en los 7 loci analizados

<i>Alelos</i>		<i>Loci</i>
245	255	TcAAAT6
251	251	
251	255	
251	247	
181	181	TcTAT20
181	184	
187	193	
193	193	
122	122	TcCAA10
122	125	
125	125	
226	226	TcAAT8
226	229	
229	229	
250	253	TcATT14
253	253	
141	144	TcGAG10
144	144	
93	93	TcTAC15

El árbol de distancias genéticas basado en el modelo de Neighbour-Joining evidenció la agrupación de los dos brotes cada uno en un clúster, para el caso del brote de Cumaral se observó la agrupación de los aislamientos humanos con los de algunos vectores y caninos, mientras que en el brote de Paz De Ariporo se observó la agrupación de los aislamientos humanos con las Zarigueyas y los caninos (Figura 32). Esto permite concluir que el brote de Cumaral posiblemente fue causado por la intrusión de triatominos en la cocina de la finca índice y posterior contaminación de alimentos con sus heces, mientras el brote de Paz de Ariporo pudo ser ocasionado por la contaminación de alimentos con secreciones odoríferas de Zarigueyas o eventualmente por contaminación con saliva de caninos.

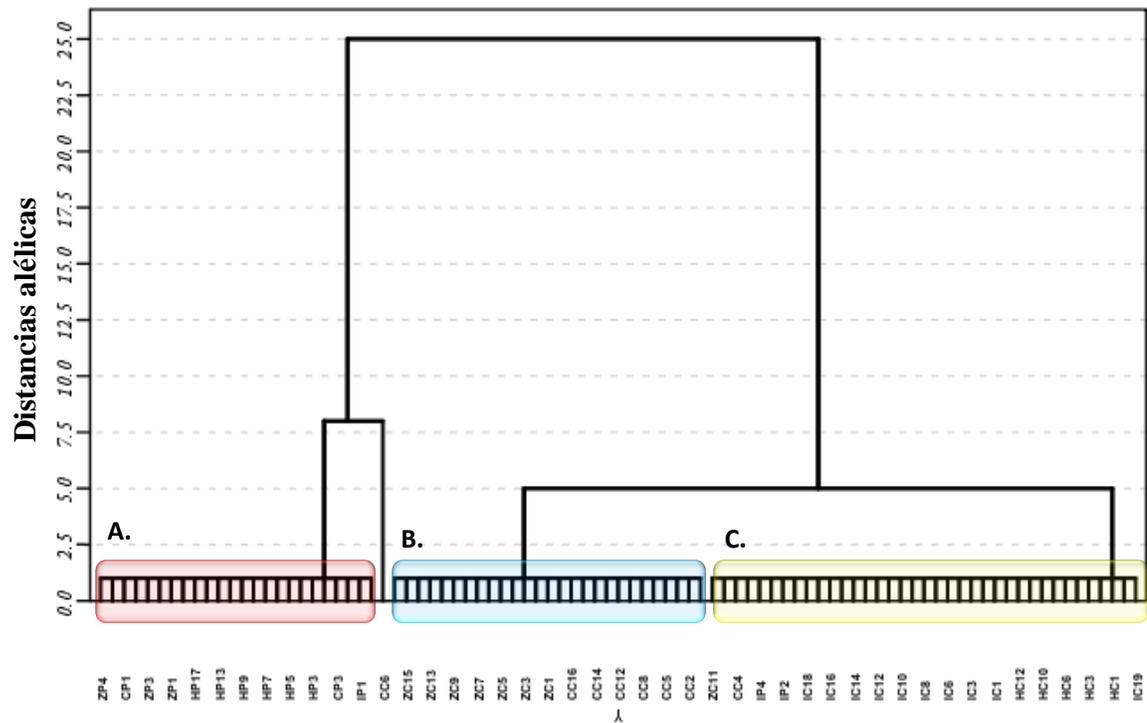


Figura 32. Árbol de distancias genéticas de microsatélites de *T. cruzi* obtenido en circuitos epidemiológicos de brotes de posible transmisión oral. A. Clúster Rojo. Formado por zarigüeyas, caninos y humanos de brote de Paz de Ariporo B. Clúster azul. Formado por zarigüeyas y caninos de brote de Cumaral C. Clúster amarillo. Muestras de insectos y humanos de brote de Cumaral.

5.1.4.3 Discusión

- Brote Cumaral

En cuanto al diagnóstico en este brote, fue tardío debido a que los pacientes se encontraban en Bogotá luego de su viaje a Cumaral, donde adquirieron la infección, y en Bogotá normalmente no existe el suficiente conocimiento acerca de los métodos de detección directa del parásito en el personal clínico, dado que no corresponde a zona endémica para enfermedad de Chagas. Adicionalmente, el departamento del Meta también es endémico para otras enfermedades febriles como malaria, dengue, Zika y chikunguya, generando que se pensara que los cuadros clínicos correspondieran a estas enfermedades.

Se logró el diagnóstico cuando se recurrió al laboratorio de parasitología del INS, evidenciando el problema que existe en el país en cuanto al desconocimiento de la enfermedad de Chagas y a la falta de experticia para la detección del parásito, ya que los 4 pacientes cumplían con la definición de caso de Chagas agudo, presentaron fiebre prolongada y la presencia de hepatomegalias, así como alteraciones cardiacas y dos de ellos fueron positivos mediante gota gruesa (3,72).

En cuanto a las herramientas de diagnóstico, se logró realizar las pruebas directas, moleculares y serológicas y correlacionarlas con las características clínicas y epidemiológicas para lograr el diagnóstico oportuno de los pacientes involucrados. Al encontrarse todas las herramientas de diagnóstico juntas se logró el abordaje correcto de los pacientes y el inicio del medicamento que alivio los síntomas. De hecho, se logró diferenciar claramente la infección en los 4 pacientes del brote, con respecto a las muestras de los pacientes que podían ser probables tanto en el restaurante de la sospecha cómo los trabajadores de la finca índice, en los que además de ser negativas las pruebas diagnósticas, no se presentaron síntomas.

Se resalta la importancia de las pruebas moleculares en el proceso de confirmación de 2 de los 4 casos que no fueron detectados por métodos directos, dado que en ellos no se podía confirmar el diagnóstico de laboratorio sin evidencia de presencia del parásito y la presencia de anticuerpos IgG puede deberse a procesos crónicos previos. Sin embargo, la presencia de ADN de *T. cruzi* en estos dos pacientes, la sintomatología en uno de ellos y el nexo epidemiológico permitieron inicialmente confirmar la infección y resalta la utilidad de las pruebas moleculares en este tipo de brotes (72,230). Los resultados de la positividad (100.0%) de la PCR en el total de los pacientes del brote, concuerda con resultados previos en algunos brotes de la amazonia brasilera y Bolivia (131,231) y difieren de otro estudio en Venezuela donde la positividad fue inferior al 85.0% (9,230).

Por lo anterior y dado que la PCR también detecta la presencia de ADN de *T. cruzi* en pacientes crónicos, posteriormente se confirmaron los dos pacientes cuyos exámenes directos fueron negativos, mediante la prueba de Tesa-Blot que evidencio las bandas asociadas a Chagas agudo (93).

En cuanto a la parasitemia encontrada en los 4 pacientes, se detectó una media de 6.2 equivalentes parásitos/mL (Log_{10} : 1.9) (Figura 31), que es una parasitemia baja teniendo en cuenta que los pacientes son agudos. Sin embargo, cabe resaltar que las muestras fueron tomadas un mes después de la infección y esto adicionalmente explica por qué no se logró fácilmente la detección del parásito mediante métodos directos en los que la sensibilidad fue solo del 50.0% similar a lo observado en Brasil y Venezuela (230,231,251). Los resultados son similares a las parasitemias observadas en brotes de transmisión oral en Venezuela (Log_{10} : 3.1) y (Log_{10} : 1.6-6.3) (9,12) y difieren de reportes previos Bolivia y Colombia donde las parasitemias son muy elevadas entre 100 a 1000 equivalentes parásitos/mL (12,28).

No hubo evidencia de insectos domiciliados en la finca índice, lo que ayuda a definir el brote como de transmisión oral. Cabe resaltar que de los insectos recolectados en el peridomicilio (*P. geniculatus* y *R. pictipes*), el 85.0% se encontraban infectados con *T. cruzi*, destacando así que pueden ser la fuente de contaminación de los alimentos involucrados en la infección. Los resultados concuerdan con otros brotes en Colombia (Aguachica, Lebrija y Bucaramanga), Venezuela y Brasil donde se han encontrado ejemplares de *P.geniculatus* positivos para *T. cruzi* relacionados con la posible contaminación de alimentos o bebidas

(28,73,76,298,312,313). Al revisar las imágenes de la finca índice, se puede observar que la cocina y los sitios de almacenamiento de alimentos se encuentran expuestos a posibles intrusiones de insectos y por ende contaminación con sus heces.

Con respecto a los reservorios la presencia del parásito se evaluó principalmente mediante métodos moleculares dadas las limitaciones de la serología en ellos. La positividad por *T. cruzi*, en los caninos puede deberse a la circulación de *P. geniculatus* infectados en la zona, como se observó en el capítulo anterior, los ejemplares recolectados en la zona se alimentan de caninos. En este caso es importante resaltar que aunque la presencia de caninos atrae los triatomíneos al peridomicilio, los caninos también se pueden considerar una barrera que evita la infección humana (70,298).

En cuanto a las zarigüeyas, cabe resaltar que se encontró positivo el análisis de sangre y el de la secreción glandular de éstas, lo que consolida los didélfidos como potencial fuente de infección, dado que la contaminación de alimentos con secreciones de didélfidos, es una de las principales fuentes de infección relacionadas con brotes de transmisión (49,70,72,74,76,276,314). Sin embargo, cabe resaltar que normalmente en el municipio de estudio no se observan los marsupiales cercanos a las casas y eso se denota en las distancias de la finca índice en las que fueron capturadas.

La principal DTU encontrada en el circuito epidemiológico en el brote de Cumaral fue TcI, esto inicialmente puede explicarse por la amplia distribución de la DTU TcI en Colombia y esta DTU ha sido la descrita en todos los brotes de transmisión oral en los que se ha tipificado el parásito en Colombia (28,47,73,76,228,315), Venezuela donde se ha reportado la presencia principalmente del genotipo TcId en todos los brotes (125,316,317), Guyana Francesa (232) y Brasil (44,250,251,318,319). En este trabajo, debido a que se encontró el genotipo TcI Selvático en todo el circuito epidemiológico y específicamente en el 100% de los pacientes involucrados, no fue posible inferir la fuente de infección mediante la tipificación.

En cuanto a las DTUs detectadas en los triatomíneos, dado que las especies *P. geniculatus* y *R. pictipes* son especies de tipo silvestre y se encontró TcI Selvático y TcIII, los resultados son congruentes y están en concordancia con lo reportado previamente en triatomíneos de estas especies y específicamente relacionados con brotes orales en Colombia, Venezuela y Brasil (28,56,250,317). En cuanto a las zarigüeyas, se detectó la presencia de TcI y TcIV como ha sido previamente descrito en Colombia e incluso en aislamientos de brotes orales de Brasil (47,56,76,318). En concordancia, con lo que se encuentra circulando en los insectos y zarigüeyas se encontraron las mismas DTUs en los caninos (Tabla 25), evidenciando que las DTUs circulantes en esta zona corresponden a parásitos del ciclo silvestre y ayudando a explicar la aparición de la transmisión oral.

Dado lo anterior, se recurrió al análisis de microsatélites para tratar de obtener información más precisa acerca del posible origen de la infección, en cuanto al análisis del árbol de distancias genéticas, se observa un clúster que identifica principalmente a las muestras obtenidas del brote de Cumaral, esto básicamente permite interpretar la similitud de los

perfiles alélicos en todo el circuito epidemiológico circulante y sugiere que el origen de este brote fue local.

Dado que dentro del clúster donde se encuentran las muestras analizadas del brote, se presentan dos agrupaciones una en la que se encuentran reservorios (Didélfidos y Caninos) que adicionalmente mostraron las mismas DTUs y otro en el que se encuentran triatomínicos y humanos que tiene en común el genotipo TcI Selvático, esto sugiere que posiblemente la infección en este caso pueda deberse a la contaminación de los alimentos o bebidas consumidas por los pacientes involucrados con heces de insectos, sobre todo si se tiene en cuenta que dentro de los triatomínicos analizados, se recolectaron insectos en fechas muy cercanas a la fecha de adquisición de la infección con el parásito, antes del reporte del brote.

Adicionalmente, los trabajadores de la finca índice, fincas circundantes o el restaurante en cuestión no presentaron síntomas, es posible que se haya presentado alguna intrusión en el sitio de preparación de alimentos en el que solo cocinaban los miembros de la familia infectada y dado que las comidas que no fueron compartidas con el menor de edad principalmente consistieron en los desayunos, en los que normalmente bebieron jugo de piña y arepas de queso, se sugiere que haya podido ser el jugo, dado que esté no requiere calentamiento y por ende no afectaría la viabilidad del parásito. Varios brotes se han asociado con variedad de jugos posiblemente contaminados con heces de triatomínicos, como acai y caña de azúcar en Brasil (251,318,320,321), guayaba en Venezuela (125,313,316,317), vino de palma en Guyana Francesa (232) y vino de palma y jugo de mandarina en Colombia (28,73), sumados a reportes de ensayos *in vitro* que han mostrado la supervivencia del parásito en diversidad de bebidas con contenido de glucosa hasta 240 horas (322–324). Adicionalmente, en Colombia se ha notificado la presencia y posible participación del vector *P.geniculatus* en 5 de los 11 brotes orales descritos e igualmente en todos los brotes orales en Venezuela (28,73,76,77).

Finalmente, cabe resaltar que en el municipio de Cumaral, principalmente se ha reportado la presencia de vectores silvestres en especial (*P.geniculatus* y *R.pictipes*), esto posiblemente se debe a la reciente y gradual implantación de viviendas en este municipio que ha alterado el hábitat y ha generado la intrusión de vectores en las viviendas especialmente de la especie *P.geniculatus* que para este caso pueden ser los que más posibilidades tienen de estar implicados en el brote ya que los ejemplares fueron recolectados en el peridomicilio a diferencia de los ejemplares de *R. pictipes* que fueron recolectados en el extradomicilio y estos últimos no han sido descritos en brotes orales, sin embargo esto no descarta que puedan estar implicados.

- **Brote Paz de Ariporo**

El suceso más importante en este brote corresponde al fallecimiento de un paciente, cuya infección fue confirmada por el hallazgo de ADN de *T. cruzi* en tejido cardíaco, en este caso el fallecimiento se dio dado que la detección del parásito fue tardía y el paciente estuvo alrededor de dos meses con la infección por el parásito, similar a este caso ocurrió en la

Amazonía brasilera en un brote en el que la falta de diagnóstico a tiempo generó la muerte de un paciente (231). Mientras que en otros brotes la letalidad ha sido asociada con superinfecciones generadas por la presencia de varios genotipos del parásito (28,315). En este paciente se confirmó la infección post-mortem y se definió como paciente agudo mediante el nexo epidemiológico, la clínica y la presencia de parásitos en el tejido cardíaco (72).

La detección tardía de los casos se debe principalmente a la confusión de la sintomatología clínica con otras enfermedades como dengue, chikunguya o malaria, esta última que permitió la detección del parásito mediante gota gruesa en el caso índice detectado que tenía un cuadro de más de 20 días con fiebre y disnea. Esto refleja la necesidad de mayor conocimiento de la enfermedad de Chagas, en especial teniendo en cuenta que Casanare es un departamento endémico para enfermedad de Chagas por lo que podría esperarse que un evento febril tan prolongado corresponda a Chagas agudo (72,74).

En el caso de las pruebas moleculares, no se logró detección en el total de los pacientes involucrados (Tabla 24), esto se ha visto previamente en el brote de Turbo, Antioquia (77) y en Venezuela (9,313). En este caso no se logró la detección en 3 pacientes, posiblemente debido al tiempo de la toma de muestra, en uno de los casos la muestra fue tomada 4 meses después de la exposición y en los otros dos casos 2 meses después. Por lo que es posible que esto no permitiera la detección del ADN y también explica la baja parasitemia observada con respecto a otros brotes orales y la baja sensibilidad de las pruebas directas (Figura 31).

En cuanto a la investigación de campo en el pozo petrolero, esta también estuvo limitada, dada la lejanía del pozo del área urbana. Sin embargo, se logró la recolección de triatominos y reservorios. Los insectos recolectados fueron *R. prolixus* encontrados en intradomicilio. La presencia de *R. prolixus* se ha descrito previamente en Casanare y en el municipio de Paz de Ariporo, donde se ha demostrado que este vector tiene la capacidad de invadir ambientes domiciliados desde ecótopos silvestres (palmas *A. butyracea*) atraídos por la luz (288,297).

En cuanto a los reservorios se tomaron muestras de los caninos y zarigüeyas, todos se encontraban muy cerca al hotel y restaurante del pozo. Se encontró positividad por *T. cruzi* en todos los reservorios. En las dos zarigüeyas se encontró la presencia del parásito en sangre y en las secreciones de las glándulas odoríferas. Es de gran importancia ya que las secreciones de glándulas odoríferas de las zarigüeyas son una importante fuente de infección en brotes orales (72,276).

En cuanto a las DTUs circulantes en el circuito epidemiológico, a diferencia de lo observado en el brote de Cumaral, en general se observó mayor frecuencia de la DTU TcI-Selvático, lo que correlaciona con otros brotes en Colombia y casos agudos aislados (28,47,76,228,325). En cuanto a las zarigüeyas se detectaron las mismas DTUs que en el brote de Cumaral, en concordancia con lo detectado en estos didélfidos en otros brotes orales (47,56,76,318).

En los ejemplares de *R. prolixus* se observó el genotipo TcI Doméstico, este genotipo también se observó en caninos y en uno de los pacientes del brote en infección mixta con TcI Selvático, lo cual concuerda debido a que *R. prolixus* es un vector domiciliado en el país y los ejemplares fueron encontrados en hábitats domiciliados, adicionalmente en uno de los ejemplares se encontró alimentación con sangre humana, los tres insectos se encontraron en las habitaciones del hotel. La presencia simultánea de los genotipos selváticos y domésticos puede deberse a que *R. prolixus* tiene la capacidad de habitar los dos hábitats y de domiciliarse en los hábitats domésticos desde las palmas, principalmente atraídos por la luz de las viviendas (288,297).

El análisis de microsátelites evidenció en un clúster los aislamientos en los que se logró la amplificación de los microsátelites analizados. Se denota que en este clúster se observa la presencia de las muestras de humanos y reservorios, mientras que los insectos se ubicaron en el clúster del brote de Cumaral. Aunque los caninos no han sido involucrados en brotes de transmisión oral, se han encontrado algunos casos de caninos con infección por *T. cruzi* en saliva (326). Esto sumado a la poca presencia de triatomíneos encontrados en la zona, permite inferir que posiblemente la infección se pudo dar mediante las secreciones glandulares de las zarigüeyas presentes en el pozo ya que los análisis de microsátelites se realizaron con las muestras de sangre y secreciones odoríferas.

El brote transcurrió en un periodo de sequía en el departamento de Casanare y específicamente en el municipio de Paz de Ariporo. La sequía generó la muerte de aproximadamente 20.000 animales y provocó que muchos animales que viven en el ambiente selvático se movilizaran hacia hábitats domésticos en búsqueda de agua y alimentos. Lo anterior sumado a que los dípteros son considerados animales sinantrópicos y su presencia en hábitats domésticos es considerada un marcador de cambios ambientales (Roque et al, 2008), explica la presencia de las zarigüeyas en los alrededores del restaurante del pozo y específicamente en el sitio donde se almacenaban agua y alimentos (Figura 30), permitiendo la posible contaminación de alguna bebida o alimento con sus secreciones anales. Previamente, se ha descrito una alta frecuencia del parásito en secreciones anales de dípteros y su presencia como fuente de infección en varios brotes de transmisión oral especialmente en Brasil y Colombia (70,72,276).

Finalmente, se destaca la utilidad de herramientas moleculares como la genotipificación y microsátelites que permitieron generar hipótesis acerca de las fuentes de infección en los dos brotes de transmisión oral, por primera vez descritos en la Orinoquía Colombiana. Aunque no se incriminó ningún alimento en especial, pues la investigación epidemiológica fue compleja dado que los pacientes se encontraban distribuidos en todo el país y el tiempo de exposición fue muy largo, se cree que pudo ser contaminación de los alimentos o frutas almacenadas en el restaurante, que estaban expuestas a la presencia de las zarigüeyas que fueron encontradas muy cerca del restaurante, por ejemplo en otros brotes orales se ha descrito la contaminación de vegetales y sopas (72,327).

Lo anterior, como consecuencia de cambios ambientales producidos por procesos de urbanización, control vectorial de triatominos domiciliados, deforestación de bosques, actividad petrolera y ganadera que finalmente producen que un mecanismo de transmisión que originalmente es el mecanismo de dispersión de *T. cruzi* entre mamíferos silvestres, ahora sea la causa de brotes de transmisión en humanos con tan elevada letalidad. Es importante tomar medidas de vigilancia en escenarios donde los cambios ambientales generados por procesos antropológicos puedan alterar los mecanismos de transmisión con el fin de evitar la presentación de nuevos brotes transmisión oral en otras zonas del país.

5.2 DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Leishmania spp.*

5.2.1 Estandarización de ensayo High resolution Melting para identificación de especies de *Leishmania spp.*

5.2.1.1 Metodología

- Muestra

Se utilizaron 6 aislamientos de referencia internacional suministrados por el CIDEIM (Centro internacional de entrenamiento e investigaciones médicas), que corresponden a las especies previamente reportadas en Colombia. (Tabla 28).

Tabla 28. Aislamientos de especies de *Leishmania spp.* reportadas en Colombia

Especie	Código
<i>L. panamensis</i>	MHOM/PA/71/LS94
<i>L. guyanensis</i>	MHOM/BR/75/M4147
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2903
<i>L. amazonensis</i>	IFLA/BR/67/PH8
<i>L. mexicana</i>	MHOM/BZ/82/BEL21
<i>L. infantum (chagasi)</i>	MHOM/TN/80/IPT1

Se utilizaron 35 aislamientos de *Leishmania*, 22 fueron obtenidos de pacientes con Leishmaniasis cutánea y visceral, 10 insectos (*Lutzomyia umbratilis* (2), *L. spinicrassa* (2), *L. trapidoi* (6)) y 3 reservorios (*Didelphis marsupialis*). En estos aislamientos previamente se determinó la especie de *Leishmania spp* mediante PCR-RFLP y/o MLEE.

- **Iniciadores utilizados para PCR-HRM**

Se realizó el diseño de iniciadores mediante el software Primer BLAST para amplificar un fragmento del gen que codifica para la proteína *HSP-70* (Heat Shock Protein 70kDa), mediante alineamiento en los software Multalin y DNASTAR-Lasergene de secuencias obtenidas en Genbank correspondientes a las 6 especies de *Leishmania spp.* hasta el momento reportadas en Colombia (*L. braziliensis* (AF291716.1), *L. panamensis* (FN395055.1), *L. guyanensis* (EU599093.1), *L. mexicana* (XM_003877072.1), *L. amazonensis* (L14605) y *L. infantum (chagasi)* (XM_003392632.1)) (Figura 33).

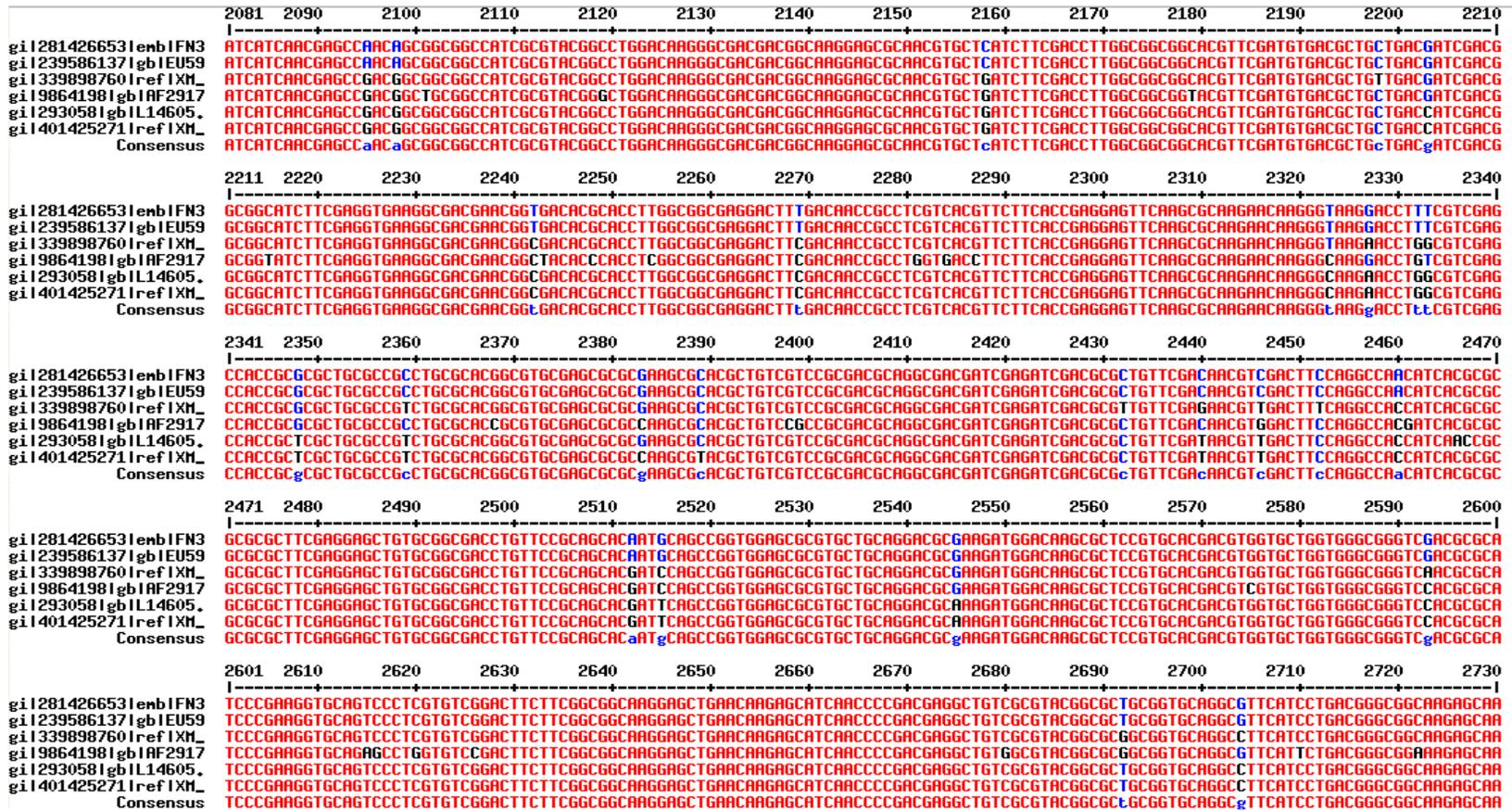


Figura 33. Alineamiento múltiple de secuencias de *HSP-70* de 6 especies de *Leishmania spp.* Se observa el alineamiento de las secuencias de GenBank, en el orden del alineamiento *L. panamensis* (FN395055.1), *L. infantum* (*chagasi*) (XM_003392632.1.), *L. guyanensis* (EU599093.1), *Leishmania braziliensis* (AF291716.1), *L. amazonica* (L14605) y *L. mexicana* (XM_003877072.1).

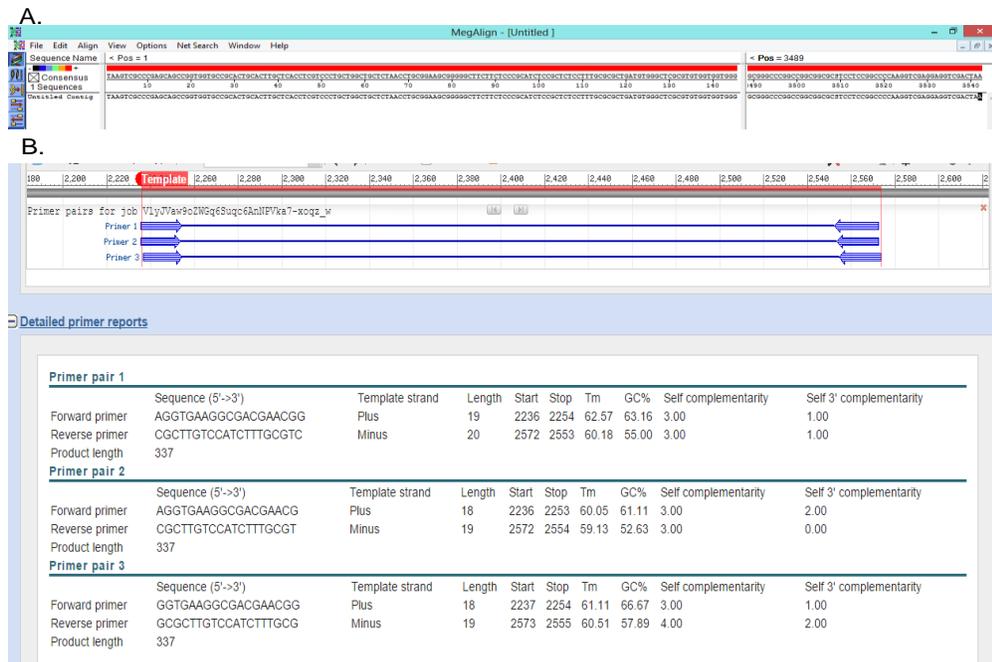


Figura 34. Secuencia consenso de alineamiento múltiple y diseño de iniciadores. A. Secuencia consenso de alineamiento múltiple obtenida mediante alineamiento con SeqMan y MultAlign, el tamaño de la secuencia consenso fue de 3542pb. **B.** Diseño de primers para amplificación de *HSP-70*, se diseñaron los primers mediante el software Primer-Blast para un fragmento menor a 500 pb.

Se seleccionó la primera opción que proporcionó Primer-Blast, HSP70F (5'-AGGTGAAGGCGACGAACG-3') y HSP70R (5'-CGCTTGTCATCTTTGCGTC-3') se realizó el alineamiento de los fragmentos obtenidos, detectando que había 28 polimorfismos y uno de ellos estaba presente en el sitio de anillamiento del iniciador reverso, por lo que él se modifica HSP70R (5'-CGCTTGTCATCTTYGCGTC-3') (Figura 35).

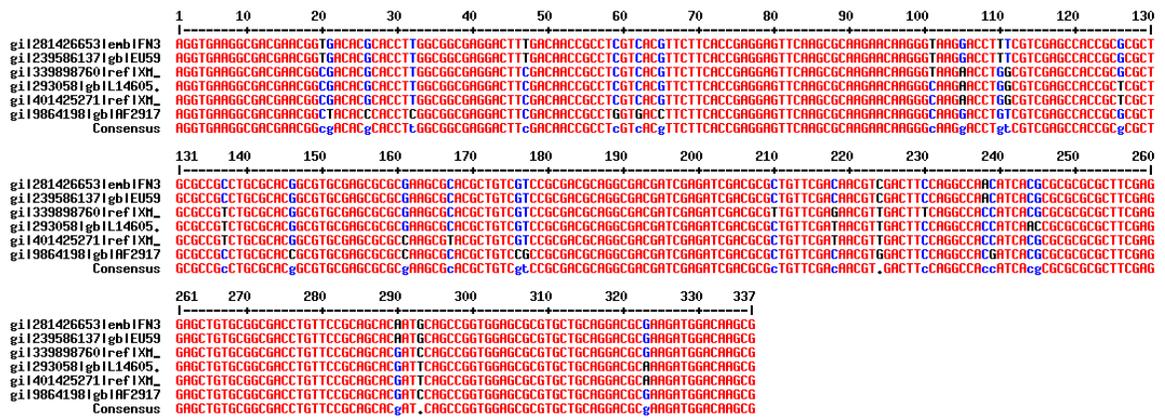


Figura 35. Alineamiento de amplicón de HSP-70 de 6 especies de *Leishmania spp.* Se realizó el alineamiento de las secuencias correspondientes al fragmento de HSP-70 amplificado mediante alineamiento de los primers sugeridos por Primer-Blast.

Para el gen ITS-1 (espaciador interno transcrito) se realizó la amplificación utilizando los iniciadores ITS1, LITSR (5' CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3') y L5.8S (5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3') descritos por El Tai et al., 2000 (328). En este blanco no se realizó diseño de iniciadores, dado que varios estudios han utilizado los iniciadores descritos por el Tai et al., 2000 en ensayos de PCR-RFLP y secuenciación, evidenciando que existen polimorfismos que permiten diferenciar especies del nuevo mundo, especialmente las del subgénero *L. (Leishmania)* (20,153,329–331).

- Montaje de PCR-HRM

El montaje del PCR acoplado al análisis de HRM se realizó en el equipo de tiempo real ABI7500 (Applied Biosystems, Inc., CA, USA). Para cada uno de los blancos a analizar (*HSP-70* e ITS-1), la mezcla de reacción estaba compuesta de la mezcla maestra a una concentración final 1X (Master Mix MeltDoctor HRM, Applied Biosystems), iniciadores de cada blanco al 5 µM, 6.6. µL de agua libre de DNAsas y 2µL de ADN a una concentración de 10 ng/µL. Se utilizó el mismo perfil térmico para los dos blancos (*HSP-70* e ITS-1), el cual consistió en: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación (95°C por 15 segundos y 60°C por un minuto). Seguido a la amplificación mediante PCR, se realizó la disociación de los productos y la detección de la temperatura de fusión, mediante el siguiente perfil térmico: denaturación 95°C por 10 segundos, 60°C por 1 minuto y el análisis de curvas de fusión de alta resolución a 95°C por 30 segundos y 60°C por 15 segundos.

Los datos de cambio de fluorescencia con respecto a los cambios de temperatura fueron recolectados en una rampa de 0.1°C/seg. Los ADNs de las cepas de referencia fueron analizados en duplicado y fueron obtenidas las curvas normalizadas y derivadas de fusión. Con las temperaturas de fusión obtenidas se calcularon las medianas y las desviaciones estándar para formular un algoritmo que permite la diferenciación de las 6 especies analizadas.

- **Parámetros de calidad**

- **Reproducibilidad:** Para verificar la reproducibilidad del ensayo de HRM, se realizó la prueba en las cepas de diferentes especies durante 15 días con los mismos alícuotas de ADN en las mismas condiciones.
- **Contaminación:** Como controles negativos para evaluar posible contaminación se utilizó la mezcla de reacción con agua (NTC) y para evaluar la especificidad se utilizó ADN de un paciente negativo para *Leishmania spp.* y de un ratón obtenido del bioterio.
- **Límite de detección:** Consiste en el número mínimo de parásitos necesarios para realizar amplificación de los genes blanco y obtención de curvas de fusión. De todas las especies se realizaron diluciones seriadas desde 10^6 parásitos/mL hasta 1 parásito/mL.
- **Precisión y exactitud:** se aplicó el procedimiento de PCR-HRM a los 35 aislamientos previamente mencionados en ciego, por duplicado, se determinó la especie mediante el algoritmo formulado y posteriormente los resultados se compararon con los resultados de PCR-RFLP y MLEE y se calculó del índice Kappa, para evaluar la concordancia.

5.2.1.2 Resultados

- **Utilidad de la técnica PCR-HRM para identificación de especies de *Leishmania spp.* circulantes en Colombia, mediante amplificación de los genes *HSP-70* e *ITS-1*.**

Los iniciadores diseñados para *HSP-70* permitieron diferenciar los subgéneros *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)*. Adicionalmente, dentro del subgénero *L. (Leishmania)* permite diferenciar la especie *L. amazonensis* y dentro del subgénero *L. (Viannia)* permite diferenciar *L. panamensis* (Figura 36). Los iniciadores para amplificación de *ITS-1* permitieron diferenciar las especies *L. infantum* y *L. amazonensis* en el subgénero *L. (Leishmania)* y las especies *L. braziliensis* y *L. guyanensis* en el subgénero *L. (Viannia)* (Figura 37). Adicionalmente, se analizaron las curvas de fusión derivadas, se ilustran algunos ejemplos en la (Figura 38).

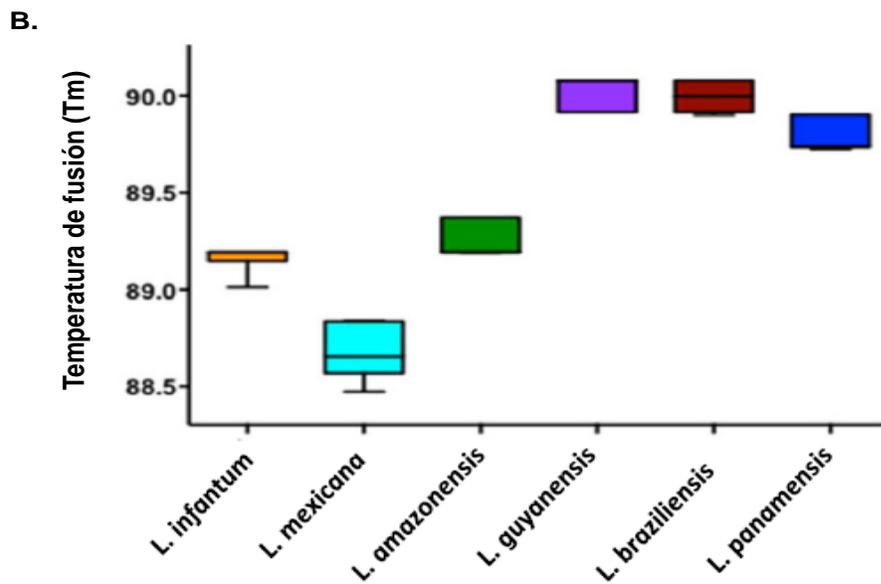
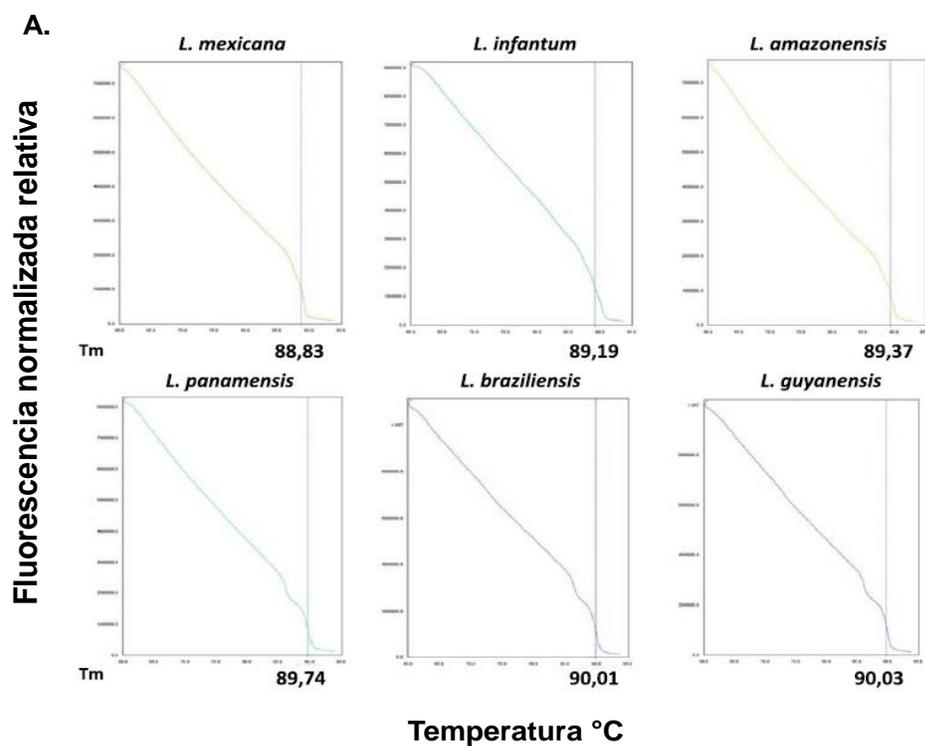


Figura 36. Curvas de fusión normalizadas y diagrama de cajas y bigotes de temperaturas de fusión del gen *HSP-70* en 6 especies *Leishmania spp.* A. Curvas de fusión normalizadas, puntos de inflexión y Tm detectado para especies de *Leishmania*. B. Diagrama de cajas y bigotes donde se observa la media y desviaciones estándar de los ensayos realizados con parásitos de aislamientos de referencia. Publicado en Hernández y colaboradores en 2014 (332).

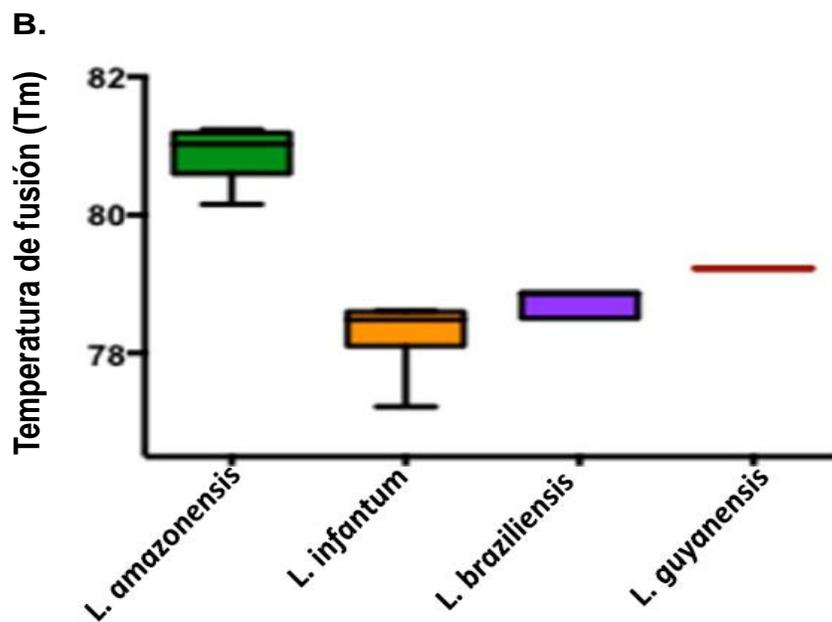
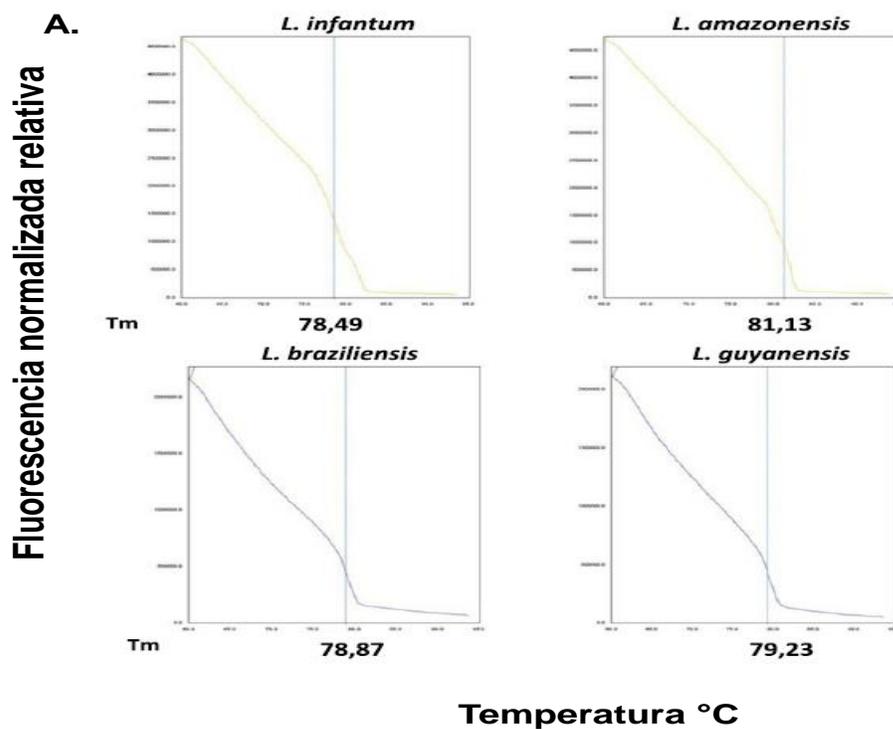


Figura 37. Curvas de fusión normalizadas y diagrama de cajas y bigotes de temperaturas de fusión del gen ITS-1 en 6 especies *Leishmania spp.* **A.** Curvas de fusión normalizadas, puntos de inflexión y Tm detectado para especies de *Leishmania*. **B.** Diagrama de cajas y bigotes donde se observa la media y desviaciones estándar de los ensayos realizados con parásitos de aislamientos de referencia. Publicado en Hernández y colaboradores en 2014 (332).

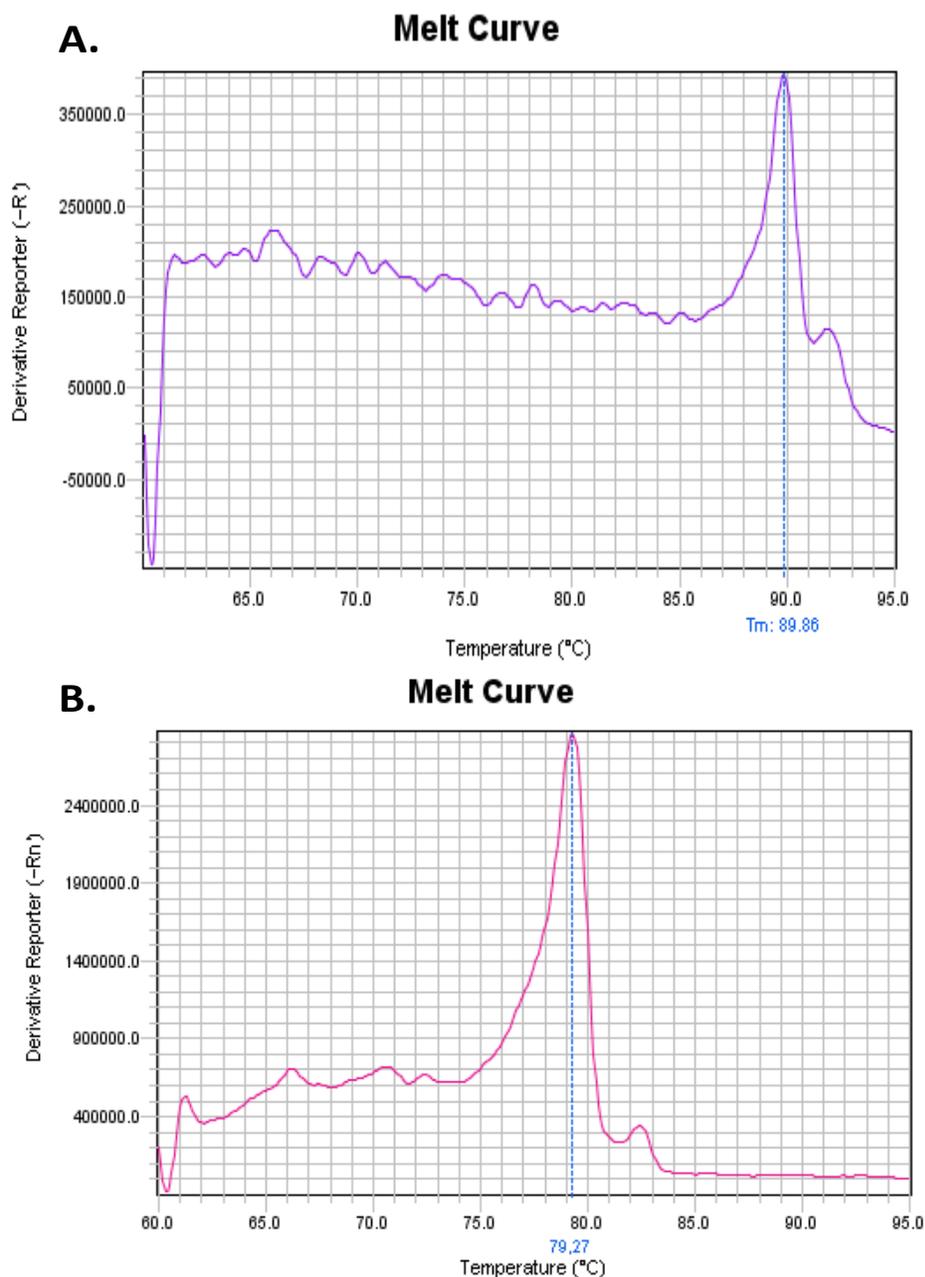


Figura 38. Curvas de fusión derivadas obtenidas de PCR-HRM de *HSP-70* e *ITS-1*. A. Curva de fusión derivada obtenida de PCR-HRM de *HSP-70* para aislamiento de *L. panamensis* **B.** Curva de fusión derivada obtenida de PCR-HRM de *ITS-1* para aislamiento de *L. guyanensis*.

Posterior a la obtención de la media y desviaciones estándar de las Tm's para cada especie, se logró la formulación de un algoritmo para la identificación de 6 especies de Leishmania, mediante la implementación de PCR-HRM a dos blancos *HSP-70* e *ITS-1* (Figura 39). Adicionalmente, en los dos blancos se observó que no hubo contaminación, el método fue

reproducibile y el límite de detección fue de 10 parásitos/mL. Tampoco hubo amplificación del ADN humano o de ratón.

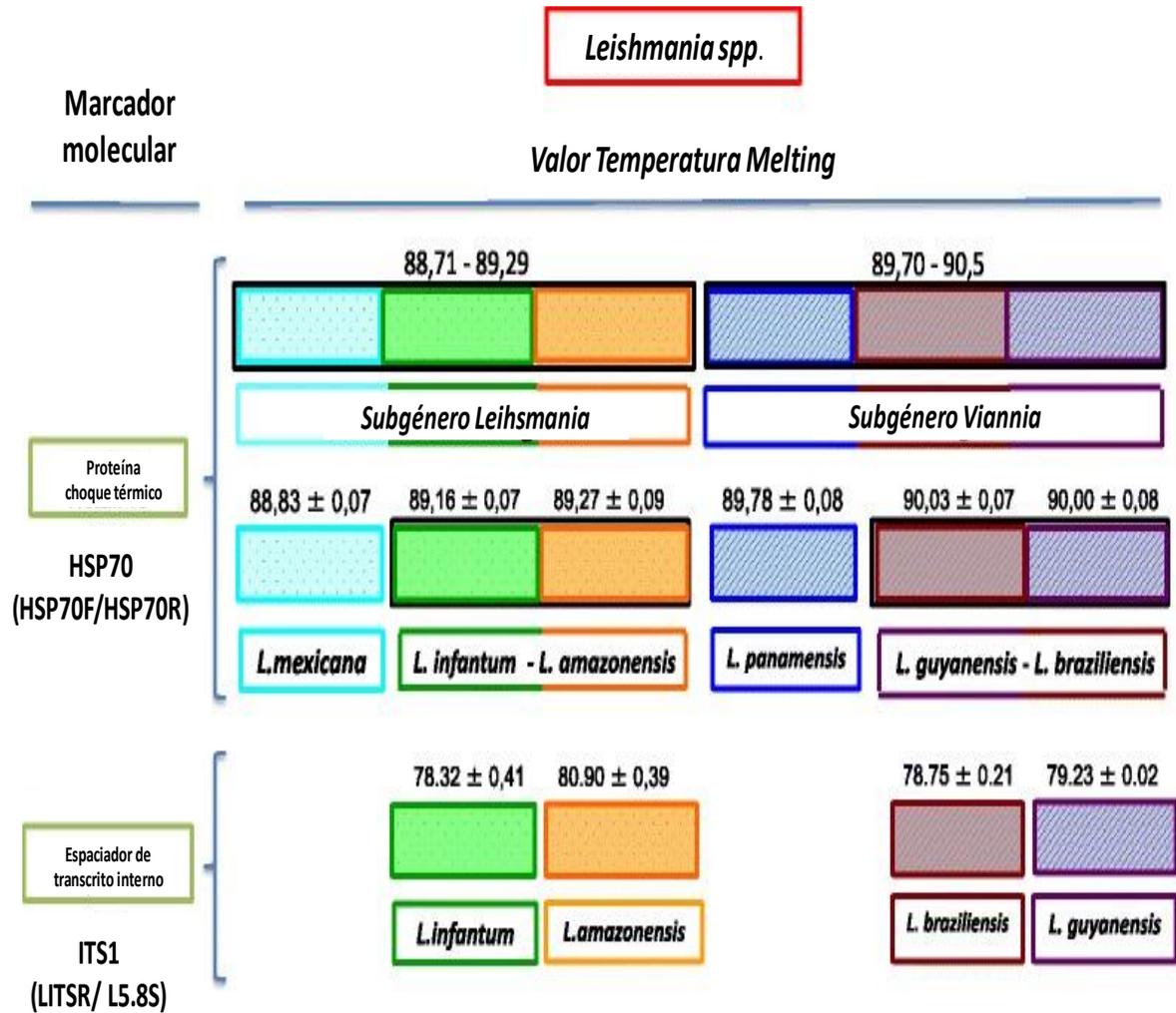


Figura 39. Algoritmo para detección de 6 especies de Leishmania mediante PCR-HRM de HSP-70 e ITS-1. Mediante las Tm obtenidas en el PCR-HRM de HSP-70 se logra diferenciar los subgéneros *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)* y las especies *L. mexicana* y *L. panamensis*, posteriormente la aplicación del PCR-HRM usando el blanco ITS-1 para diferenciar *L. infantum* y *L. amazonensis* en el subgénero *L. (Leishmania)* y *L. braziliensis* de *L. guyanensis* en el subgénero *L. (Viannia)*.

La aplicación de este algoritmo se realizó en 35 aislamientos, en los que previamente se había realizado identificación de especies con los métodos disponibles hasta el momento (PCR-RFLP y MLEE). El índice Kappa entre el análisis PCR-HRM y los métodos de referencia fue de 1.0 (Tabla 29).

Tabla 29. Resultados de identificación de especies de *Leishmania spp.* en aislamientos obtenidos de pacientes, insectos y reservorios.

Origen geográfico	Hospedero	PCR-RFLP/MLEE	HSP70	Tm	ITS1	Tm
Meta	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis/L. braziliensis</i>	90.08	<i>L. guyanensis</i>	79.22
Santander	<i>Lutzomyia umbratilis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis/L. braziliensis</i>	90.07	<i>L. guyanensis</i>	79.21
Boyacá	<i>Lutzomyia umbratilis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis/L. braziliensis</i>	90.07	<i>L. guyanensis</i>	79.23
Santander	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. infantum (chagasi)</i>	<i>L. infantum/L. amazonensis</i>	89.21	<i>L. chagasi</i>	79.21
Santander	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	89.91	<i>L. panamensis</i>	-
Meta	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis/L. braziliensis</i>	90.08	<i>L. braziliensis</i>	78.77
Boyacá	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis/L. braziliensis</i>	90.09	<i>L. braziliensis</i>	78.55
Boyacá	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis/L. braziliensis</i>	90.06	<i>L. guyanensis</i>	79.22
Boyacá	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	89.73	<i>L. panamensis</i>	-
Meta	<i>Lutzomyia spinicrassa</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis/L. braziliensis</i>	90.09	<i>L. braziliensis</i>	78.77
Meta	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	89.73	<i>L. panamensis</i>	-
Meta	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	89.83	<i>L. panamensis</i>	-
Meta	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	89.73	<i>L. panamensis</i>	-
Santander	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. infantum (chagasi)</i>	<i>L. infantum/L. amazonensis</i>	89.14	<i>L. chagasi</i>	78.33
Santander	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. infantum (chagasi)</i>	<i>L. infantum/L. amazonensis</i>	89.17	<i>L. chagasi</i>	78.56

Santander	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. infantum (chagasi)</i>	<i>L. infantum/L. amazonensis</i>	89.19	<i>L. chagasi</i>	78.55
Antioquia	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>	88.75	<i>L. mexicana</i>	-
Antioquia	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum/L. amazonensis</i>	89.19	<i>L. amazonensis</i>	80.61
Antioquia	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum/L. amazonensis</i>	89.19	<i>L. amazonensis</i>	80.77
Antioquia	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	89.79	<i>L. panamensis</i>	-
Antioquia	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	89.73	<i>L. panamensis</i>	-
Antioquia	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis/L. braziliensis</i>	90.04	<i>L. braziliensis</i>	78.77
Antioquia	<i>Lutzomyia spinicrassa</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis/L. braziliensis</i>	90.08	<i>L. braziliensis</i>	78.89
Meta	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis/L. braziliensis</i>	90.09	<i>L. braziliensis</i>	78.91
Meta	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis/L. braziliensis</i>	90.04	<i>L. guyanensis</i>	79.27
Meta	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. infantum (chagasi)</i>	<i>L. infantum/L. amazonensis</i>	89.22	<i>L. chagasi</i>	78.67
Meta	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. infantum (chagasi)</i>	<i>L. infantum/L. amazonensis</i>	89.29	<i>L. chagasi</i>	78.66
Boyacá	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum/L. amazonensis</i>	89.14	<i>L. amazonensis</i>	81.11
Boyacá	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. guyanensis/L. braziliensis</i>	90.02	<i>L. braziliensis</i>	78.66
Santander	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis/L. braziliensis</i>	90.04	<i>L. guyanensis</i>	79.22
Santander	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. guyanensis/L. braziliensis</i>	90.01	<i>L. guyanensis</i>	79.22
Santander	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>	88.37	<i>L. mexicana</i>	-
Santander	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	89.82	<i>L. panamensis</i>	-

Santander	<i>Homo sapiens</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	89.81	<i>L. panamensis</i>	-
Santander	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. panamensis</i>	89.86	<i>L. panamensis</i>	-

5.2.1.3 Discusión

En este trabajo se diseñó un ensayo utilizando la técnica PCR acoplada a HRM, dado que es una prueba menos dispendiosa, rápida y más económica que las utilizadas previamente en el país para identificación de especies. Por estas razones esta técnica ha sido utilizada previamente para identificación de especies o variantes genéticas de varios patógenos (333–336). Incluso ha sido utilizada también para identificación de diferentes subgéneros y especies de *Leishmania spp.* circulantes en el viejo y nuevo mundo (23,196,337–340).

En nuestro estudio se seleccionaron como blancos los genes *HSP-70* e ITS-1, ya que son genes ampliamente utilizados para diagnóstico y tipificación de especies de *Leishmania spp* (10,11,37,189,328,329). En el caso del gen *HSP-70* se realizó el diseño de iniciadores teniendo en cuenta que presenta 28 polimorfismos para las 6 especies que fueron incluidas en el estudio y descritas previamente en Colombia (157)

La aplicación de la PCR-HRM con gen *HSP-70* dio como resultado temperaturas melting que permitieron la discriminación de los subgéneros *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)*, esto concuerda con reportes previos del uso de este gen mediante otras técnicas como secuenciación y PCR-RFLP, para diferenciación de los subgéneros *L. (Leishmania)* y *L. (Viannia)* (21,137,145,146,195,329,341).

Adicionalmente, el PCR-HRM del gen *HSP-70* permitió la discriminación de los complejos *L. mexicana* de *L. infantum* - *L. amazonensis* y *L. panamensis* de *L. braziliensis*–*L. guyanensis*. La discriminación de *L. mexicana* y *L. amazonensis*, no se ha reportado previamente mediante PCR-HRM a diferencia de la discriminación de *L. guyanensis* y *L. panamensis*, que se ha reportado previamente utilizando PCR-HRM para el gen *6PGD* (23,337,340).

La discriminación de *L. mexicana* y *L. amazonensis*, que es de gran importancia debido a la asociación de *L. amazonensis* con la forma cutánea difusa y su resistencia al tratamiento de primera línea (195), sin embargo tampoco se ha logrado mediante PCR-RFLP del gen *HSP-70* (21,137,145,146,195,329,342). En cuanto a la diferenciación entre *L. guyanensis* y *L. panamensis*, está se logra también mediante la aplicación de PCR-RFLP del gen *HSP-70* con la enzima de restricción *BccI* (137).

Los rangos de temperaturas melting para el gen ITS-1, permitieron la discriminación de las especies *L. infantum (chagasi)* de *L. amazonensis* que se ha descrito mediante PCR-RFLP (189,343) y la discriminación de *L. braziliensis* de *L. guyanensis*, esta última de gran utilidad dado que estas dos especies están involucradas con leishmaniasis mucocutánea y su respuesta

al tratamiento es diferencial (213,214,343,344). Sin embargo, la discriminación entre *L. braziliensis* y *L. guyanensis* solo se ha reportado previamente con esté blanco mediante secuenciación (10,189,329) y mediante PCR-HRM de los genes *MPI* y *6PGD* (23).

El algoritmo propuesto permite la identificación de *L. mexicana*, *L. infantum (chagasi)*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis* con una PCR en tiempo real, mediante el análisis de HRM posterior a la amplificación de los genes HSP70 e ITS1. La técnica de HRM es considerada como una herramienta para reducir algunos problemas que pueden presentar técnicas como el MLEE y la PCR-RFLP, evitando problemas de contaminación ya que el sistema es cerrado, procesos de secuenciación posteriores, procedimientos laboriosos, altos costos y ofreciendo resultados robustos y con una alta eficiencia, es por esto que se ha usado en varios estudios para identificación de especies de *Leishmania spp.* circulante en el nuevo y el viejo mundo (23,180,196,340). Adicionalmente el análisis PCR-HRM se ha reportado ser más económico y rápido que otros tipos de análisis, tales como MLST y RFLPs.

Los resultados de nuestro estudio apoyan la idea de que los genes, HSP70 y ITS1 son buenos candidatos para la identificación de especies de *Leishmania* neotropicales, ya confieren una alta probabilidad de ser detectados debido a su alto número de copias (10,40,145,328). Del mismo modo, con respecto a la especificidad, este método no causa reacciones cruzadas con ADN de mamíferos a diferencia de lo observado en otros estudios (340). Este hecho hace que HRM un buen candidato para la identificación de *Leishmania* en estudios epidemiológicos. La técnica es reproducible, y esto se mantuvo a pesar de que las muestras se corrieron por duplicado y en diferentes días.

La concordancia de la identificación de especies del PCR-HRM, observada en los 35 aislamientos analizados con respecto al estándar de oro PCR-RFLP / MLEE fue del 100%, lo que sugiere que está técnica para análisis epidemiológicos de la circulación de especies de *Leishmania spp.* en el circuito epidemiológico y su dinámica de transmisión. Otra característica importante de nuestro ensayo además de su reproducibilidad fue la sensibilidad obtenida que evidenció que la técnica es capaz de detectar al menos 10 parásitos / ml lo cual es un valor considerable.

Finalmente, la técnica de PCR-HRM utilizada en este estudio presenta un enorme potencial para la identificación de especies de *Leishmania spp.* del nuevo Mundo. Sin embargo, es importante señalar que aislamientos estudiados corresponden únicamente a cepas colombianas. Por lo tanto, se sugiere que este nuevo método se implemente en cepas de Mesoamérica con el fin de validar la viabilidad de la técnica

5.2.2 Identificación de especies de *Leishmania spp.* mediante secuenciación del gen citocromo b.

5.2.2.1 Metodología

- **Muestra**

Se analizaron en total 328 aislamientos de *Leishmania spp.* obtenidos de Humanos (312), Insectos (10) y Reservorios (6). Los aislamientos fueron recolectados entre el periodo comprendido entre 1988 y 2001.

- **Amplificación de gen *Citocromo b*.**

La amplificación del gen Citocromo b se realizó mediante los iniciadores reportados por Romano et al., 2014, CYTBFor (5'-AGCGGAGAGRARAGAAAAGG-3') y CYTBRev (5'-GYTCRCAATAAAATGCAAATC-3'), que permiten la amplificación de un fragmento de 618pb (Romano et al., 2014). La mezcla de reacción estaba compuesta por la mezcla maestra (GoTaq® Green Master Mix) a una concentración final 1X, iniciadores 0.5 µM, 7 µL de agua y 3 µL de ADN para un volumen final de 25 µL. El perfil térmico consistió en un ciclo de denaturación inicial de 94° C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de 94° C por 1 minuto, 60° C por 1 minuto y 72° C por 1 minuto, finalmente la extensión final se realizó a 72° C por 10 minutos. Se tomaron 5 µL de los productos de amplificación y se determinó su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, utilizando TBE 0.5X y aplicando un voltaje de 100V. Los geles fueron teñidos con GelRed™ y observados en el Analizador de Imágenes Quantity One, utilizando el software One Dscan (BioRad).

• **Secuenciación del gen *Citocromo b***

La secuenciación de los productos de amplificación se realizó mediante el método de Sanger en los dos sentidos (Forward y Reverse). Las secuencias obtenidas fueron identificadas mediante BLAST, para verificación inicial de las secuencias. Posteriormente, la edición y secuencia consenso entre las secuencias de dos sentidos se realizó mediante DNASTAR Lasergene. La secuencia consenso fue nuevamente sometida a BLAST para establecer la especie presente en el aislamiento.

- **Análisis de resultados**

Con las secuencias obtenidas se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud, utilizando el software MEGA 6, mediante el modelo de Timura 3 parámetros y para medir la robustez de los nodos se realizó bootstrap de 1000 réplicas. Se calcularon frecuencias de las especies en los diferentes hospederos y se construyeron mapas de distribución de las especies detectadas utilizando el software ArcGis.

5.2.2.2 Resultados

- **Utilidad de secuenciación del gen *citocromo b* para identificación de especies de *Leishmania spp* en Colombia.**

La secuenciación del gen *Citocromo b* permitió la identificación de las especies *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. equatoriensis*, *L. infantum*, *L. lansonii*, *L. mexicana*, *L. peruviana*, y *L. colombienseis*. Las secuencias obtenidas mostraron un promedio de identidad del 98% con las secuencias reportadas en GenBank. En general, la concordancia entre MLEE y Citocromo b fue alta (Índice Kappa Cohen 0,833 $p < 0,05$). Se presentaron incongruencias en 19 (5,8%) aislamientos.

En cuatro aislamientos en los que no se logró identificación mediante MLEE se detectaron 2 cepas como *L. colombienseis* y 2 como *L. equatoriensis*. En 2 aislamientos que se tipificaron por MLEE como *L. guyanensis*, se obtuvo como resultado *L. lansonii* por citocromo b y 2 tipificados como *L. mexicana* por MLEE se encontraron mediante citocromo B como *L. amazonensis*. Se observaron 11 cepas que mostraron un perfil híbrido *L. panamensis* / *L. braziliensis* por MLEE y mediante secuenciación de citocromo b se clasificaron como *L. panamensis*. Todas las incongruencias observadas y los aislamientos en los que se identificó *L. braziliensis*/*L. peruviana*, fueron confirmadas mediante secuenciación del gen *HSP-70* encontrándose que los aislamientos identificados como *L. peruviana* corresponden a *L. braziliensis*. En cuanto a las incongruencias en los 19 aislamientos mencionados fueron concordantes 100% entre los resultados de *HSP-70* y los obtenidos mediante secuenciación de citocromo b (Figura 40).

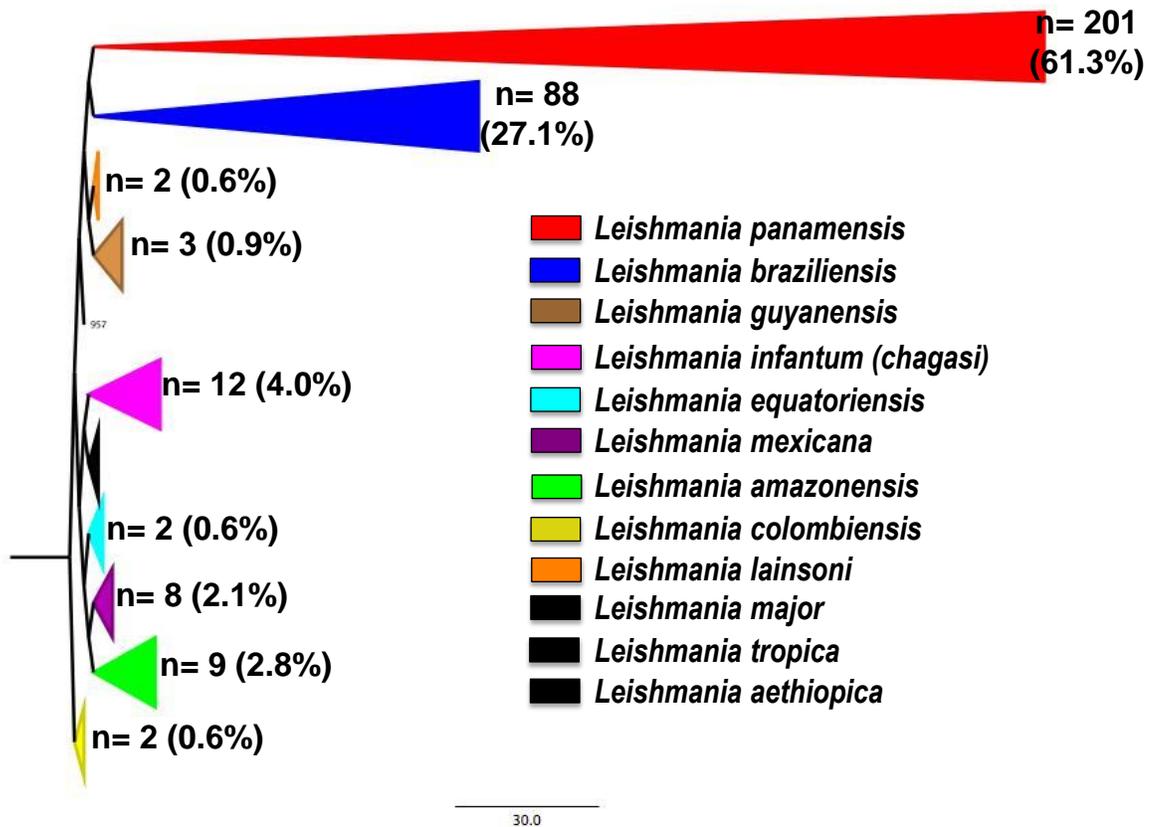


Figura 40. Frecuencia de especies de *Leishmania* spp detectadas mediante secuenciación de citocromo b. Árbol de máxima verosimilitud, se evidencian las 7 especies

y sus frecuencias en las muestras analizadas reportadas previamente en Colombia y se reportan dos nuevas especies *L. equatoriensis* y *L. lansonii*.

- **Distribución geográfica y en circuito epidemiológico, de especies de especies de *Leishmania spp* entre los años 1984 a 2001 en Colombia.**

Se logró la obtención del mapa con distribución de especies en el país, con la inclusión de las dos nuevas especies reportadas con respecto a los reportes anteriores realizados por Corredor et al.,1990, Saravia et al.,1998 y Ovalle et al.,2006 (157–159) (Figura 41).

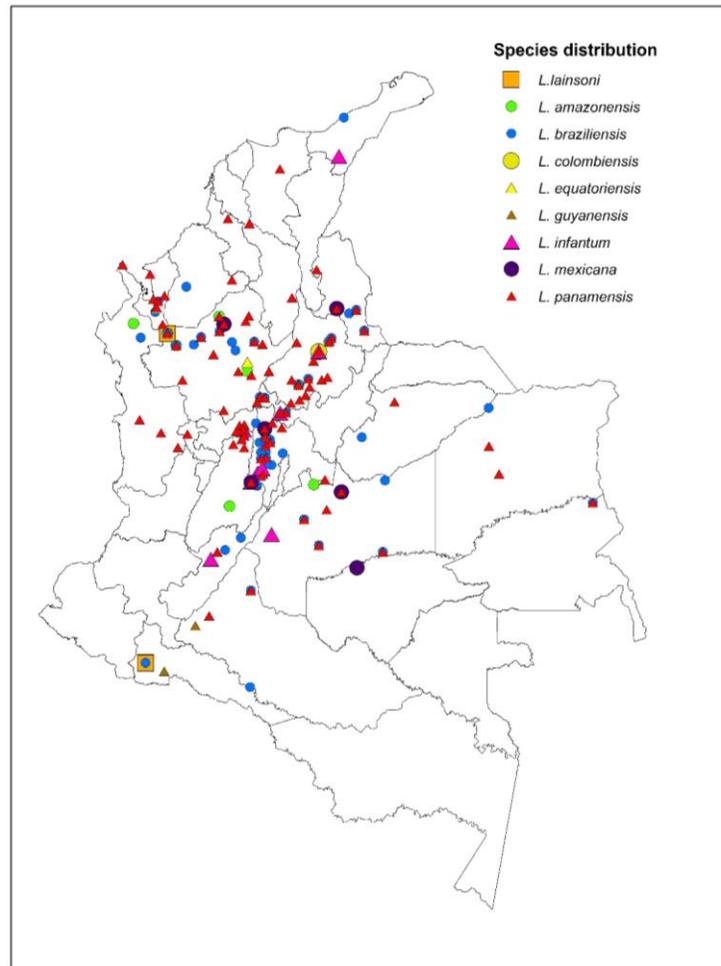


Figura 41. Actualización de distribución de especies de *Leishmania spp.* en Colombia. Se observa la distribución de 9 especies de *Leishmania spp.* detectadas en todo el circuito epidemiológico.

Los aislamientos fueron recolectados en 22 departamentos del país. Siendo los departamentos de Antioquia (n=73), Cundinamarca (n=65) y Santander (n=58) los que presentaron mayor número de aislamientos (Figura 42).

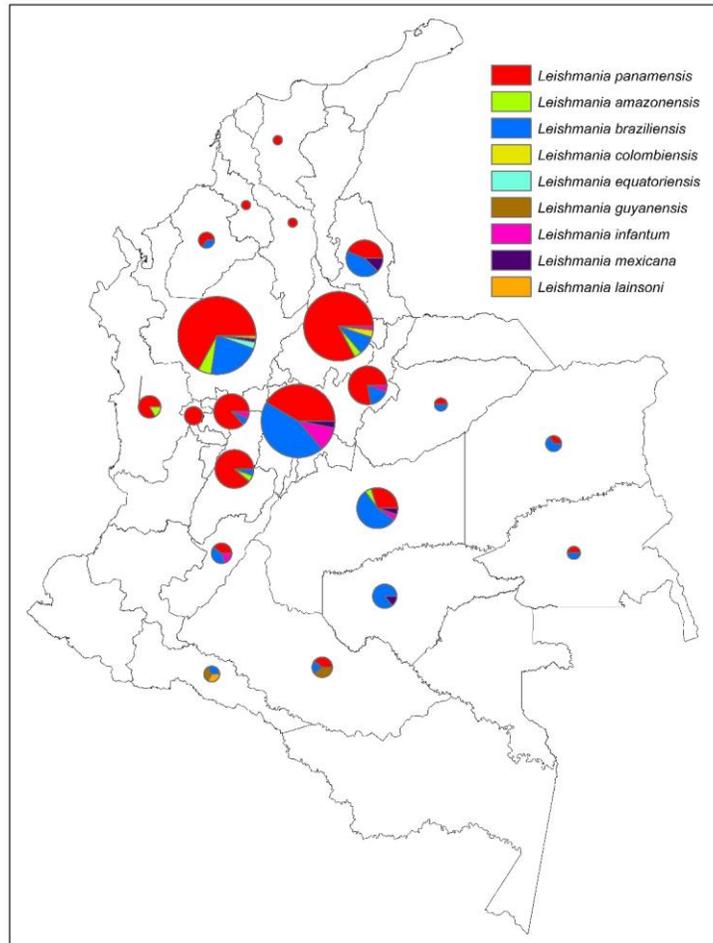


Figura 42. Distribución de 9 especies de *Leishmania* spp. por departamento en Colombia. Se muestra la distribución de las 9 especies reportadas en 22 departamentos, el tamaño de los círculos es proporcional a la cantidad de aislamientos recolectados por departamento.

Adicionalmente, se logró la detección de especies en todo el circuito epidemiológico. En los humanos se encontraron 8 de las 9 de especies detectadas, en los reservorios e insectos se encontraron 4 especies (Figura 43).

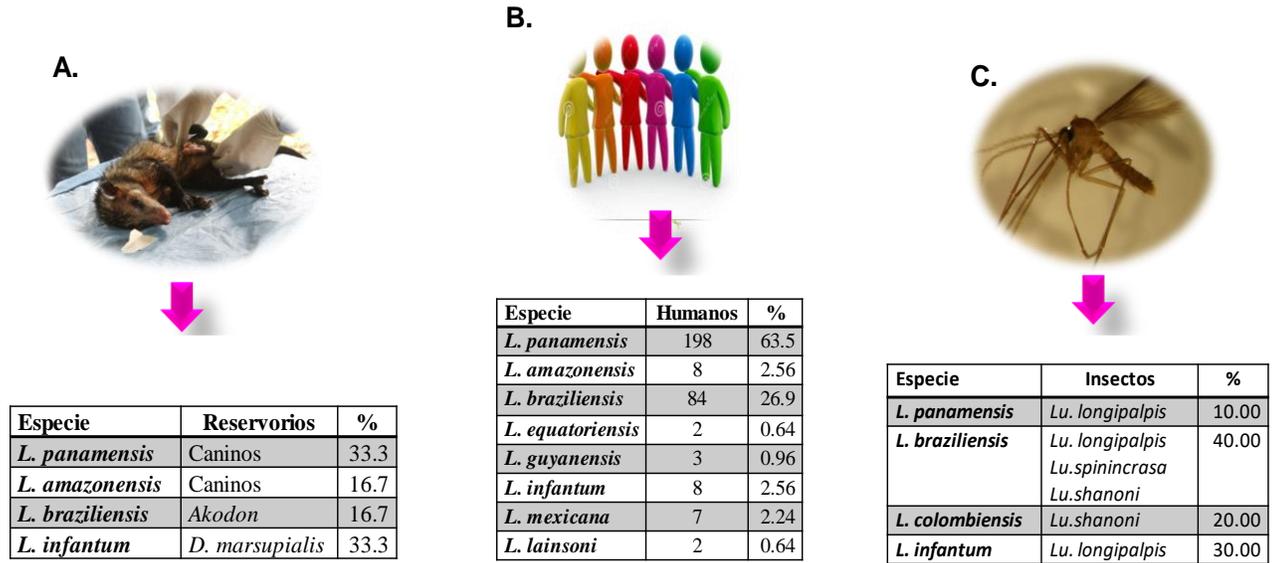


Figura 43. Frecuencia de especies de *Leishmania spp.* en circuito epidemiológico. A. Especies detectadas en *Didelphis marsupialis*, *Akodon affinis* y caninos. **B.** En humanos se detectó la especie *L. infantum* asociada con leishmaniasis visceral, las restantes se encontraron asociadas con leishmaniasis cutánea y pocos casos de leishmaniasis mucocutánea, las dos especies de nuevo reporte (*L. equatoriensis* y *L. lansonii*) se detectaron en este hospedero. **C.** Especies detectadas en insectos de las especies *Lutzomyia spinicrassa*, *Lutzomyia longipalpis* y *Lutzomyia shannoni*.

5.2.2.3 Discusión

A pesar del impacto de las leishmaniasis en Colombia y especialmente de la leishmaniasis cutánea, no existen estrategias en el país para realizar seguimiento de la incriminación de especies con las formas clínicas o respuesta terapéutica de la enfermedad. Los estudios de identificación de especies de *Leishmania spp.* se limitan a tan solo cuatro estudios, de los cuales solamente abarca las especies circulantes en todo el circuito epidemiológico de la enfermedad (157–159,345). No se han reportado estudios actualizados acerca de la distribución de especies en el país y en los reportados únicamente se han utilizado las técnicas de MLEE y PCR-RFLP, en tres de estos estudios se reporta la imposibilidad de identificar la especie en algunos aislamientos. Adicionalmente, a pesar de que diferentes marcadores genéticos se han descrito ampliamente para discriminar especies, en Colombia no se han implementado marcadores genéticos hasta el momento en aislamientos de *Leishmania spp.*

En este estudio se realizó la secuenciación del gen *citocromo b*, y se construyó el mapa de distribución de especies de *Leishmania spp.* en el país, encontrándose la presencia de 9 especies de *Leishmania spp.* Al construir el árbol de máxima verosimilitud se observan agrupaciones correspondientes a los subgéneros de las especies identificadas agrupadas, similar a lo observado en otros trabajos utilizando como marcador el gen *citocromo b* (143,199,200,202–204,346).

Dentro de las especies detectadas, 2 reportes son nuevos en Colombia y corresponden a *L. equatoriensis* y *L. lansonii*, las dos nuevas especies fueron detectadas en aislamientos obtenidos de humanos. Para el caso de *L. equatoriensis* se ha detectado originalmente en mamíferos de Ecuador como *Choloepus hoffmani* y *Sciurus granatensis* (347), pero no se informa en los seres humanos hasta el momento, estos dos mamíferos se distribuyen en Colombia y en el caso de *C. hoffmani* se ha detectado naturalmente infectado con *L. braziliensis* (348). Adicionalmente, se ha reportado que ejemplares de *Lu. evansi* se pueden alimentar con sangre de *S. granatensis*, por lo que se puede deducir que este mamífero puede ser un reservorio de *L. equatoriensis* spp. en Colombia (349). Estos hallazgos podrían explicar la presencia de *L. equatoriensis* en nuestro país y su detección en dos casos en el departamento de Antioquia (norte de Colombia), sin embargo, es importante tener en cuenta que se ha descrito que las especies de *L. hertigi* y *L. equatoriensis*, son cercanas al género *Endotrypanum* spp. (143,250).

El segundo reporte corresponde *L. lansonii*. Esta especie se ha descrito en Brasil, Perú y Bolivia, en aislamientos de humanos, flebótomos y reservorios mamíferos (350,351). El vector flebótomo principalmente asociado con *L. lansonii* es *Lu. ubiquitalis* y como reservorios los mamíferos *Agouti paca*, *Cebus apella* y *Mesocricetus auratus* (351,352).

En Colombia, se ha informado la presencia de los flebótomos *Lu. ubiquitalis* en Caquetá que es muy cercano al departamento de Putumayo donde fue detectado uno de los casos y adicionalmente los reservorios *Agouti paca*, *Cebus paella* y *Mesocricetus auratus* se han descrito ampliamente en el país (353–355). Estos hallazgos pueden explicar el porqué de la infección en los dos casos de *L. lansonii* detectados y sumado a ello cabe resaltar que es posible la presencia de más casos, que no han sido detectados por los métodos tradicionales.

En cuanto al resto de las especies detectadas en este estudio, se observó que *L. panamensis* y *L. braziliensis*, son las especies más frecuentes en todos los aislamientos y específicamente en los humanos lo que está en concordancia con lo detectado previamente (157–159,345).

Adicionalmente, se detectaron las especies *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* y *L. infantum* en casos de leishmaniasis cutánea y *L. infantum* en casos de leishmaniasis visceral. La especie autóctona *L. colombiensis* que también se ha informado en Venezuela y Panamá, en este estudio se detectó en el flebótomo *Lu. shannoni*. Los estudios de laboratorio indican que tres especies de parásitos de *Leishmania* spp, *L. mexicana*, *L. panamensis* y *L. infantum* pueden desarrollarse en *Lu. shannoni* (356). *Lu. shannoni* se alimenta de mamíferos, incluyendo seres humanos, y se ha informado que puede transmitir la leishmaniasis visceral en perros, hámsteres y otros mamíferos. Este sería el primer informe de infección natural de *Lu. shannoni* con *L. colombiensis*, ya que se han reportado la infección natural solamente en *Lu. hartmanii* y *Lu. gomezi* (138,357,358).

La distribución de la leishmaniasis en un contexto ecológico es variable. Incluye la migración de los flebótomos y las adaptaciones de las especies de *Leishmania* a las especies de

flebótomos, la adaptación de los insectos vectores a ecosistemas alterados y la adaptación a fuentes de alimentación diferentes como lo son la sangre humana y de animales domésticos (359,360). Por otro lado, el alto número de desplazamientos humanos en Colombia por el conflicto armado en el país ha favorecido la mayor distribución de las diferentes especies en el país. Recientemente en nuestro país la migración de *L. guyanensis* se detectó a partir de los bosques de las regiones del Orinoco a dos hábitats diferentes Amazonas y los valles interandinos situados por encima de los 1.000 metros en el municipio de Chaparral (Tolima) y a Sucre, en la costa caribeña de Colombia (158).

La secuenciación del gen *citocromo b* ha sido ampliamente utilizada para identificación de especies de *Leishmania spp* (143,200,202,203,361,362). La OMS sugiere la técnica de MLEE como el "patrón oro" para la identificación de especies, pero este método es laborioso y complicado por lo se limita su potencial como un estándar de oro (363).

Recientemente, el uso de PCR-RFLP dirigida a los genes proteínas de choque térmico ha mostrado un potencial razonable para la identificación de especies (40). Además, el uso la técnica de PCR-HRM ha sido útil para este propósito (23,339,332). Sin embargo, todos estos métodos presentan algunos inconvenientes que la secuenciación de genes puede resolver. De hecho algunos autores han demostrado la utilidad de la amplificación del *citocromo b* en muestras clínicas y de flebótomos debido a su alta sensibilidad ya que se estima que el citocromo b presenta entre 25 y 50 copias por cada célula, es altamente específico y dado que es un marcador uniparental presenta escasa heterocigosidad convirtiéndose en un marcador muy informativo (40,144,199).

En este estudio, la secuenciación directa del gen *citocromo b* permitió la discriminación de las nueve especies de *Leishmania* y sólo en el caso de *L. braziliensis* se tuvo que realizar la confirmación mediante secuencia de HSP70, debido a que el porcentaje de identidad de algunas muestras en GenBank fue igual para *L. braziliensis* y *L. peruviana*. Sin embargo, la congruencia entre secuenciación de *citocromo b* y la técnica MLEE fue alta (Índice Kappa = 0.833 $p < 0.05$).

Se observó la asignación incorrecta de *L. colombiensis*, *L. equatoriensis*, *L. mexicana* y *L. lainsoni*, mediante la técnica de MLEE, esto se puede deber a la incapacidad de las enzimas utilizadas previamente para discriminar estas especies. En 1990, Corredor et al., reportó un bajo porcentaje de aislamientos con "identidad incierta" por MLEE, estos aislamientos corresponden a la especie *L. colombiensis*. De igual manera, en el estudio de Urbano et al., en el 2011, tampoco logró la tipificación de algunos aislamientos mediante MLEE y PCR-RFLP, estos aislamientos corresponden a las especies adicionales que fueron identificadas en este estudio (*L. equatoriensis* y *L. lainsoni*) (157,345).

Los resultados de este estudio demuestran el alto potencial en el uso de secuenciación de *citocromo b* para identificación de especies en el nuevo mundo como se ha demostrado en Argentina y adicionalmente pueden ser el comienzo para iniciar análisis de MLST de *Leishmania* que hasta al momento no han sido realizados en Colombia (204,364).

6 CONCLUSIONES

- Se logró la implementación de técnicas moleculares para diagnóstico y epidemiología molecular de la enfermedad de Chagas y las leishmaniasis, proporcionando nuevo conocimiento acerca de la dinámica de transmisión de los parásitos *T. cruzi* y *Leishmania spp*, en diferentes escenarios clínicos y epidemiológicos en Colombia.
- El desempeño diagnóstico de las pruebas moleculares para diagnóstico de la enfermedad de Chagas, fue muy óptimo durante la fase aguda y bueno durante la fase crónica. Por lo anterior, las técnicas moleculares constituyen herramientas de apoyo diagnóstico en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, especialmente en los casos en los que las pruebas usadas convencionalmente presentan discordancias.
- En pacientes con enfermedad de Chagas en Colombia, se reafirma que la DTU TcI es la de mayor prevalencia, seguida de la DTU TcII. Estos dos DTUs mostraron diferencias en cuanto a cargas parasitarias y capacidades operativas de las técnicas moleculares, posiblemente debido a la diferencia de número de copias del ADN satélite nuclear.
- En pacientes crónicos se observó mayor frecuencia y carga parasitaria del genotipo TcI Doméstico en comparación con TcI Silvestre, posiblemente el genotipo doméstico ha logrado adaptación al huésped humano, produciendo mayor parasitemia y menor invasión a tejidos y por ende facilita la cronicidad de la enfermedad, como se ha observado en modelos murinos.
- El uso de la técnica de qPCR para el seguimiento del tratamiento etiológico en pacientes crónicos, evidenció que la positividad disminuye posterior al tratamiento como se ha observado previamente para Benzonidazol, más es importante tener en cuenta que la técnica presenta baja sensibilidad en este grupo de pacientes. Sin embargo, cabe resaltar que se observó disminución de la carga parasitaria significativamente en aquellos pacientes que presentaron positividad en la qPCR.
- Mediante qPCR, se observó persistencia del parásito post tratamiento etiológico con los dos medicamentos utilizados, probablemente debido a resistencia del parásito dado que las DTUs involucradas en dicha persistencia fueron TcI (genotipo TcI Doméstico) y TcII, de las que se ha descrito resistencia *in vitro* y en modelos murinos.
- La elevada frecuencia de infección con *T. cruzi*, presencia de DTUs asociadas con ciclos domésticos, alimentación con sangre humana, y la presencia en hábitats domiciliados de las especies de triatominos consideradas como vectores secundarios (principalmente *T. maculata* y *P. geniculatus*), resaltan la importancia de estas especies en la transmisión del parásito. Indicando que la intrusión de estas especies en el domicilio representa un

alto riesgo de infección al humano bien sea por el mecanismo vectorial u oral y por ende se requiere el diseño de estrategias de control dirigidas a estas especies secundarias.

- Los resultados obtenidos para *P. geniculatus* reflejan posible riesgo de domiciliación de esta especie y su gran potencial como vector de *T. cruzi*. Esto dado que posee una gran adaptación a diferentes fuentes alimenticias, puede albergar diferentes DTUs y genotipos TcI del parásito, mostró elevada invasión de hábitats domiciliados y ha sido incriminado en los brotes de transmisión oral que se han presentado en Colombia.
- Las técnicas moleculares son herramientas útiles para diagnóstico de *T. cruzi* en estudios de brote, ya que algunos pacientes en los que no se detectó el parásito mediante pruebas directas, si se logró la detección de su ADN y posteriormente se confirmó la infección aguda mediante la detección de anticuerpos SAPA mediante Tesa-Blot. Adicionalmente, las técnicas moleculares permiten la detección del parásito en reservorios y triatomos, en los que las técnicas directas y serológicas, presentan muy baja sensibilidad.
- El análisis de microsátelites permitió deducir que el brote de Cumaral posiblemente se deba a la contaminación de alimentos con heces de triatomos, sumado a ello se detectó TcI Selvático en los insectos y pacientes. Mientras que, para el brote de Paz de Ariporo, los casos posiblemente se deban a la contaminación de alimentos con secreciones de reservorios como lo son las secreciones de *D. marsupialis* o la saliva de caninos.
- La metodología de PCR-HRM diseñada en este estudio, permite la identificación de las seis especies descritas hasta el momento en Colombia de manera más sencilla y económica que con el estándar de oro MLEE, adicionalmente se observó una concordancia del 100% entre las dos técnicas.
- Mediante la aplicación del PCR-HRM dirigida al blanco *HSP-70* se logró diferenciar las especies *L. mexicana* y *L. amazonensis*, dos especies de compleja identificación y de importancia dada la capacidad de *L. amazonensis* para causar formas difusas que no responden adecuadamente a los tratamientos de primera línea.
- El gen ITS-1 mediante amplificación por PCR-HRM, permitió la diferenciación de las especies *L. braziliensis* y *L. guyanensis*, esta identificación es de importancia clínica dado que las dos especies se encuentran comúnmente causando leishmaniasis mucocutánea y su respuesta al tratamiento es diferente.
- El análisis de amplificación y secuenciación del gen *citocromo b*, es de gran utilidad para la identificación de especies de *Leishmania spp.* en el país, ya que permitió la detección de dos especies adicionales a las descritas previamente *L. equatoriensis* y *L. lainsoni*.
- Mediante secuenciación del gen *citocromo b*, se logró la detección de especies que previamente no habían logrado detectarse por la técnica MLEE, mostrando el elevado potencial de esta técnica para ser usado en la tipificación de especies de *Leishmania spp.*

7 ANEXOS

7.1 Protocolos

- 7.1.1** Protocolo para toma, conservación y extracción de ADN en muestras de sangre en clorhidrato de guanidina para diagnóstico molecular y genotipificación de *Trypanosoma cruzi* (Archivo 1)
- 7.1.2** Protocolo de PCR en Tiempo Real (qPCR) para detección y cuantificación de ADN de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre de pacientes con enfermedad de Chagas (Archivo 2)
- 7.1.3** Protocolo de PCR convencional para detección y genotipificación de ADN de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre de pacientes con enfermedad de Chagas (Archivo 3)
- 7.1.4** Análisis de curvas de fusión de alta resolución HRM (High Resolution Melting) para diferenciación de seis especies de *Leishmania spp* del nuevo mundo (Archivo 4).

7.2 Publicaciones

- 7.2.1** León CM, Hernández C, Montilla M, Ramírez JD. Retrospective distribution of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro: 1-7, 2015 (Archivo 5).
- 7.2.2** Cruz L., Vivas A., Montilla M., Hernández C., Flórez C., Parra E., & Ramírez JD (2015). Comparative study of the biological properties of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in a murine experimental model. Infection, Genetics and Evolution, 29, 110–117. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.012> (Archivo 6).
- 7.2.3** Gómez-Melendro EN, Hernández C, González-Uribe C, Brochero H. First Record of *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera: Reduviidae: Triatomini) in the Municipality of Riohacha, La Guajira - Colombia. Front Public Health. 2014;2:219. doi: 10.3389/fpubh.2014.00219. eCollection 2014 (Archivo 7).
- 7.2.4** Hernández C, Alvarez C, González C, Ayala M, León C, Ramírez J. Identification of Six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. Parasit Vectors. 2014 Nov 14;7(1):501 (Archivo 8).
- 7.2.5** Hernández C, Cucunubá Z, Parra E, Toro G, Zambrano P, Ramírez JD. Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) and HIV coinfection in Colombia. Int J Infect

Dis. 2014 Sep; 26:146-8. doi: 10.1016/j.ijid.2014.04.002. Epub 2014 Jul 28 (Archivo 9).

- 7.2.6** Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. *Zoonoses and Public Health*. 2014 Nov; 61(7):477-9. doi: 10.1111/zph.12094. doi: 10.1111/zph.12094 (Archivo 10).
- 7.2.7** Hernández C, Ramírez JD. Molecular Diagnosis of Vector-Borne Parasitic Diseases. *Air Water Borne Diseases* 2013; 2: 110. doi: 10.4172/2167-7719.1000110 (Archivo 11).
- 7.2.8** Villa LM, Guhl F, Zabalá D, Ramirez JD, Urrea DA, Hernández DC et al. The identification of two *Trypanosoma cruzi* I genotypes from domestic and sylvatic transmission cycles in Colombia base on a single polymerase chain reaction amplification of the spliced-leader intergenic región. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*. 2013: 1-4 (Archivo 12).

7.3 Presentaciones en congresos

- 7.3.1** Hernández C, Cucunubá ZM, Flórez AC, Olivera M, Valencia C, Zambrano P, Agreda D, Guasmayan L, Ramírez JD. Evaluación de técnicas moleculares para el diagnóstico y la genotipificación de pacientes en todas las fases de la enfermedad de Chagas en Colombia. XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Octubre 21 a 23 de 2015. *Memorias Biomédica*. Biomédica 2015;35(Supl.4) p:183. Presentación Oral (Archivo 13).
- 7.3.2** Hernández C, Brochero H, Vera M, Parra-Henao GJ, Buitrago LE, Teherán A, et al., Identificación de fuentes alimenticias e infección por *Trypanosoma cruzi* en diferentes especies de triatominos vectores de enfermedad de Chagas. XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Octubre 21 a 23 de 2015. *Memorias Biomédica*. Biomédica 2015;35(Supl.4) p:138. Presentación Oral (Archivo 13).
- 7.3.3** Cucunubá Z, Olivera M, Hernández C, Flórez C, Herazo R, Ágreda D, Valencia C, Nicholls S. Detección del genotipo TcI-silvestre de *Trypanosoma cruzi* y su asociación con la gravedad de la cardiomiopatía chagásica, en una cohorte colombiana. XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Octubre 21 a 23 de 2015. *Memorias Biomédica*. Biomédica 2015;35(Supl.4) p:161. Presentación Oral (Archivo 13).
- 7.3.4** Cárdenas-Portilla JA, Hernández C, León CM, Ayala MS, López MC, Ramírez JD. Evaluación de la diversidad genética de *Leishmania* mediante el análisis de secuencia

de multilocus en Colombia, resultados preliminares. XVI Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Octubre 21 a 23 de 2015. Memorias Biomédica. Biomédica 2015;35(Supl.4) p:170. Presentación Oral (Archivo 13).

- 7.3.5** Hernández C; León CM; Valencia-Hernández C; Vera MJ; Cucunubá ZM; Flórez AC et al., Molecular tracking of Chagas disease outbreaks by possible oral transmission route in Colombia. Congreso Internacional de Parasitología. ICOPA. Agosto 10 a 15 2014. Presentación oral (Archivo 14).
- 7.3.6** Hernández C; Alvarez C; González C; Ayala MS; León CM; Ramírez JD. Deployment of an accurate High Resolution Melting (HRM) assay for the discrimination of New World Leishmania species. Congreso Internacional de Parasitología. ICOPA. Agosto 10 a 15 de 2014. Presentación poster (Archivo15).
- 7.3.7** Hernández C; Brochero H; Parra-Henao GJ; Sotelo-Londoño A; Gómez N; Ardila S; Ramírez JD. Description of Trypanosoma cruzi DTUs in Triatoma maculata, Panstrongylus geniculatus and Rhodnius pictipes from Colombia. Congreso Internacional de Parasitología. ICOPA. Agosto 10 a 15 de 2014. Presentación poster (Archivo 16).
- 7.3.8** León CM; Hernández C; Montilla M; Ramírez JD. Restrospective distribution of Trypanosoma cruzi I genotypes (Domestic TcI and Sylvatic TcI) in Colombia. Congreso Internacional de Parasitología. ICOPA. Agosto 10 a 15 de 2014. Presentación Poster (Archivo 17).
- 7.3.9** Cruz L; Vivas A; Montilla M; Hernández C; Flórez C; Parra E; Ramírez JD.. Presentación poster titulada: Deciphering the biological properties of an enigmatic Trypanosoma cruzi I domestic genotype (TcI-Dom). Congreso Internacional de Parasitología. ICOPA. Agosto 10 a 15 de 2014. Presentación Poster (Archivo 18).
- 7.3.10** Hernandez C, Cucunubá Z, Parra E, Toro G, Zambrano P, Ramírez JD. Diagnostico mediante PCR de un caso fatal de coinfección de enfermedad de Chagas y VIH/sida. Memorias XIII Encuentro científico Instituto Nacional de Salud. Biomédica 2013; 33 (Supl. 2): 76. Presentación poster (Archivo 19).
- 7.3.11** Hernandez DC. Diagnóstico Molecular de Leishmania. II Taller de fortalecimiento a la Vigilancia en Salud Publica de la Leishmaniasis con énfasis en Leishmaniasis visceral. Bogotá, Junio 12-14, 2013. Presentación oral (Archivo 20).
- 7.3.12** Hernández C, Villa LM, Cucunubá ZM, Montilla M, Trejo JA, Alvarado U, et al. Caracterización molecular de aislamientos de Trypanosoma cruzi obtenidos de

paciente con Chagas Agudo. XLVII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, Cali, Octubre 9-13, 2012. Presentación oral (Archivo 21).

7.4 Becas obtenidas

7.4.1 2014 Beca estudiante de Maestría para participación en Workshop Molecular Parasitology. Ciudad de México (Archivo 22).

7.4.2 2014 Beca estudiante de Maestría para participación en en Workshop Eupath DB. Universidad de Georgia, USA (Archivo 23).

7.4.3 2013 Beca a estudiante de Maestría para participación en II Curso Internacional de Biología Molecular de Tripanosomatídeos e II Simpósio Internacional em Biologia Molecular da Doença de Chagas. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-Parana, Brasil (Archivo 24).

7.5 Consentimientos informados y avales éticos

7.5.1 Consentimiento informado. Proyecto 4. Caracterización de una cohorte de pacientes con enfermedad de Chagas, su tratamiento etiológico, eventos adversos y respuesta terapéutica (Archivo 25).

7.5.2 Autorización expresa para la utilización de datos y muestras para futuros estudios centro de control de datos y muestras CCDM Red Chagas (Archivo 26).

7.5.3 Consentimientos informados para pacientes agudos (adultos y menores de edad) (Archivo 27).

7.5.4 Aval comités de investigación y ética del Proyecto 4. Caracterización de una cohorte de pacientes con enfermedad de Chagas, su tratamiento etiológico, eventos adversos y respuesta terapéutica (Archivos 28 y 29).

7.6 Publicación sometida

7.6.1 Sometimiento de artículo en revista Plos Neglected Tropical Diseases: "Evaluation of PCR platforms for Diagnosis of Chagas disease: parasitic loads and Discrete Typing Units in Acute and Chronic phases" (Archivo 30)

8 BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Weekly epidemiological record - Chagas diseases in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. 2015 p. 5–13.
2. WHO. Leishmaniasis : worldwide epidemiological and drug access update. 2012 p. 24.
3. INS. Protocolo de vigilancia en salud publica Chagas. 2014 p. 28.
4. Britto C, Cardoso A, Silveira C, Macedo V, Fernandes O. Polymerase chain reaction (PCR) as a laboratory tool for the evaluation of the parasitological cure in Chagas disease after specific treatment. *Medicina (B Aires)* [Internet]. 1999;59 Suppl 2:176–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10668261>
5. Ramírez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-Neto JA, et al. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *J Clin Microbiol*. 2009 Dec;47(12):3945–51.
6. Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LHC, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. BioMed Central Ltd; 2010;10(1):337.
7. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(1).
8. Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MF a D, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop*. 2013;125(1):23–31.
9. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e2000.
10. Tsokana CN, Athanasiou L V, Valiakos G, Spyrou V, Manolakou K, Billinis C. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis , Species Identification and Phylogenetic Analysis. *Leishmaniasis - Trends Epidemiol Diagnosis Treat*. 2014;161–93.
11. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. *J Clin Microbiol*. 2007;45(1):21–5.
12. Ramírez JC, Cura CI, Moreira C, Lages-silva E, Juiz N, Velázquez E, et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagnostics*. 2015;17(5).
13. Mikita K, Maeda T, Yoshikawa S, Ono T, Miyahira Y, Kawana A. The Direct Boil-LAMP method: A simple and rapid diagnostic method for cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Int* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2014;63(6):785–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2014.07.007>
14. Sriworarat C, Phumee A, Mungthin M, Leelayoova S, Siriyasatien P. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of *Leishmania* infection. *Parasit Vectors*. Parasites & Vectors; 2015;8:1–8.

15. Khan MGM, Bhaskar KRH, Salam MA, Akther T, Pluschke G, Mondal D. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. *Parasit Vectors*. 2012;5(1):280.
16. Adams ER, Schoone GJ, Ageed AF, El Safi S, Schallig HDFH. Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(4):591–6.
17. Thekisoe OMM, Coronel-Servian AM, Fukumoto S, Kawazu SI, Inoue N, Rodriguez C V., et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(5):855–60.
18. Nzelu CO, Gomez EA, Cáceres AG, Sakurai T, Martini-Robles L, Uezato H, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for *Leishmania* infection. *Acta Trop* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;132(1):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.016>
19. de Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol*. 2006;140(3–4):231–8.
20. Monroy-Ostria A, Nasereddin A, Monteon VM, Guzmán-Bracho C, Jaffe CL. ITS1 PCR-RFLP diagnosis and characterization of *Leishmania* in clinical samples and strains from cases of human cutaneous leishmaniasis in states of the Mexican Southeast. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2014;2014.
21. Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin J-C, Van Der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 {PCRs} for global *Leishmania* species identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2012;31(7):1453–61. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L51731586>
22. Higuera SL, Guhl F, Ramírez JD. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. 2013;1–6.
23. Tsukayama P, Núñez JH, De Los Santos M, Soberán V, Lucas CM, Matlashewski G, et al. A FRET-Based Real-Time PCR Assay to Identify the Main Causal Agents of New World Tegumentary Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1).
24. Boité MC, Mauricio IL, Miles MA, Cupolillo E. New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of *Leishmania* (Viannia) Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(11).
25. Ramírez JD, Tapia-calle G, Guhl F. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* in Colombia revealed by a High-throughput Nuclear Multilocus Sequence Typing (nMLST) approach. *BMC Genet*. 2013;14:2–10.
26. Marlow MA, Boite MC, Ferreira GEM, Steindel M, Cupolillo E. Multilocus Sequence Analysis for *Leishmania braziliensis* Outbreak Investigation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(2).

27. Diosque P, Tomasini N, Lauthier JJ, Messenger LA, Monje Rumi MM, Ragone PG, et al. Optimized multilocus sequence typing (MLST) scheme for *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2014;8(8):e3117. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4148231&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
28. Ramírez JD, Montilla M, Cucunubá ZM, Floréz AC, Zambrano P, Guhl F. Molecular Epidemiology of Human Oral Chagas Disease Outbreaks in Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(2):1–7.
29. Aluru S, Hide M, Michel G, Bañuls AL, Marty P, Pomares C. Multilocus microsatellite typing of *Leishmania* and clinical applications: a review. Parasite [Internet]. 2015;22(VI):16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25950900>
30. Krayter L, Bumb RA, Azmi K, Wuttke J, Malik MD, Schnur LF, et al. Multilocus microsatellite typing reveals a genetic relationship but, also, genetic differences between Indian strains of *Leishmania tropica* causing cutaneous leishmaniasis and those causing visceral leishmaniasis. Parasit Vectors [Internet]. 2014;7:123. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3987047&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
31. Feilij H, Muller L, Gonzalez Cappa SMM, Cappa SMG. Direct Micromethod for Diagnosis of Acute and Congenital Chagas Disease. J Clin Microbiol. 1983 Aug;18(2):327–30.
32. Da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. Trends Parasitol. 2001;17(6):286–91.
33. Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, Gonzalez A, Rangel-Aldao R, et al. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. Transfusion [Internet]. 2003;43(1):91–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12519436>
34. Malchiodi EL, Chiamonte MG, Taranto NJ, Zwirner NW, Marni RA et al. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp ; use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen. Clin Exp Immunol. 1994;97(3):417–23.
35. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. Clin Vaccine Immunol. 2007;14(8):1045–9.
36. Guzmán-Gómez D, López-Monteon A, Lagunes-Castro MDS, Álvarez-Martínez C, Hernández-Lutzon MJ, Dumonteil E, et al. Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz , Mexico : role of the antigen used for diagnostic. Parasit Vectors [Internet]. Parasites & Vectors; 2015;1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1072-2>
37. Singh S, Dey A, Sivakumar R. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. Expert Rev Mol Diagn. 2005;5:251–65.

38. Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ*. 2006;333(7571):723.
39. Elmahallawy EK, Sampedro Martínez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, et al. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(8):961–72.
40. Van der Auwera G, Dujardin JC. Species typing in dermal leishmaniasis. *ClinMicrobiolRev*. 2015;28(1098–6618 (Electronic)):265–94.
41. Simpson AGB, Stevens JR, Lukeš J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol*. 2006;22(4):168–74.
42. Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8):1–13.
43. Zingales B, Miles M, Campbell D, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;12(2):240–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
44. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell D, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(7):1051–4.
45. Guhl F, Ramírez JD. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision? *Acta Trop* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;119(1):1–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.002>
46. Burgos JM, Begher SB, Freitas JM, Bisio M, Duffy T, Altchek J, et al. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral chagas disease in a patient with AIDS. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(6):1016–8.
47. Guhl F, Ramírez JD. Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia. *Infect Genet Evol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;20:148–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.028>
48. Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA. Chagas Cardiomyopathy Manifestations and *Trypanosoma cruzi* Genotypes Circulating in Chronic Chagasic Patients. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2010;4(11):e899. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000899>
49. Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2015;13(8):995–1029. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/14787210.2015.1056158>
50. Zumaya-Estrada F, Messenger L, Lopez-Ordóñez T, Lewis MD, Flores-Lopez C, Martínez-Ibarra AJ, et al. North American import? Charting the origins of an enigmatic *Trypanosoma cruzi* domestic genotype. *Parasit Vectors*. 2012;5(1):226.
51. Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, et al. Genome-Scale Multilocus Microsatellite Typing of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Unit I Reveals Phylogeographic Structure and Specific Genotypes Linked to Human Infection. *PLoS Pathog* [Internet]. 2009;5(5):e1000410. Available from:

- <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000410>
52. Ramírez JD, Guhl F, Messenger L a., Lewis MD, Montilla M, Cucunuba Z, et al. Contemporary cryptic sexuality in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Ecol*. 2012;21(17):4216–26.
 53. Messenger L a., Llewellyn MS, Bhattacharyya T, Franzén O, Lewis MD, Ramírez JD, et al. Multiple mitochondrial introgression events and heteroplasmy in *Trypanosoma cruzi* revealed by maxicircle MLST and next generation sequencing. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(4).
 54. Ramírez JD, Turriago B, Tapia-Calle G, Guhl F. Understanding the role of dogs (*Canis lupus familiaris*) in the transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Colombia. *Vet Parasitol [Internet]*. Elsevier B.V.; 2013;196(1–2):216–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.054>
 55. Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Urdaneta-Morales S, Martínez C, et al. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in venezuela. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6).
 56. Monteiro WM, Magalhães LKC, de Sá ARN, Gomes ML, Toledo MJ de O, Borges L, et al. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS One*. 2012;7(7).
 57. Ramírez J, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez a. C, Parra E, et al. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. *Zoonoses Public Health*. 2013;1–3.
 58. Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop [Internet]*. Elsevier B.V.; 2015;151(1):166–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015>
 59. Rassi A, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):275–91.
 60. Barges MD, Schofield CJ, Dujardin JP. Classification and Phylogeny of the Triatominae [Internet]. First Edit. American Trypanosomiasis. Elsevier Inc.; 2010. 117-147 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00006-X>
 61. Waleckx E, Gourbière S, Dumonteil E. Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):324–38.
 62. Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatomíneos (Reduviidae : Triatominae) en Colombia. *Biomédica*. 2007;27:143–62.
 63. Schmunis GA. Prevention of Transfusional *Trypanosoma cruzi* Infection in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(SUPPL. 1):93–101.
 64. Guhl F, García M, Ching R, Juliao O, Jaramillo C, Pachón D, et al. Enfermedad de Chagas Transfusional en Colombia. *Trib Médica [Internet]*. 1991;91(1):129–36. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000040&pid=S0074-0276199900070008100005&lng=en

65. Armando Cortés Buelvas FG, Barraza M. Enfermedad de Chagas transfusional en Cali, Colombia. *Colomb Med*. 1995;26(1).
66. Sánchez LV, Ramírez JD. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology*. 2012;1–13.
67. Cucunubá ZM, Valencia-Hernández C a., Puerta CJ, Sosa-Estani S, Torrico F, Cortés JA, et al. Primer consenso colombiano sobre Chagas congénito y orientación clínica a mujeres en edad fértil con diagnóstico de Chagas. *Infectio* [Internet]. SECOT; 2014;18(2):50–65. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0123939214000046>
68. Castellanos YZ, Cucunubá ZM, Flórez AC, Orozco-Vargas LC. Reproducibility of serological tests for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women in an endemic area of Santander, Colombia. *Biomedica* [Internet]. 2014;34(2):198–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967925>
69. Altclas J, Sinagra A, Jaimovich G, Salgueira C, Luna C, Requejo A, et al. Reactivation of chronic Chagas' disease following allogeneic bone marrow transplantation and successful pre-emptive therapy with benznidazole. *Transpl Infect Dis*. 1999;1(2):135–7.
70. Roque ALR, Xavier SCC, Da Rocha MG, Duarte ACM, D'Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted chagas disease outbreaks. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79(5):742–9.
71. Toso A, Vial F, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Med Chil*. 2011;139:258–66.
72. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2012;54(6):845–52.
73. Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC, Vallejo GA. Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* : una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *Biomédica*. 2014;631–41.
74. Coura JR. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):277–82.
75. Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2009;104 Suppl:101–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753464>
76. Soto H, Tibaduiza T, Montilla M, Triana-Chávez O, Suárez DC, Torres Torres M, et al. Investigación de vectores y reservorios en brote de Chagas agudo por posible transmisión oral en Aguachica, Cesar, Colombia. *Cad Saúde Pública* [Internet]. 2014;30(4):746–56. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v30n4/0102-311X-csp-30-4-0746.pdf>
77. Ríos JF, Arboleda M, Montoya AN, Alarcón EP, Parra Henao GJ. Probable brote de transmisión oral de enfermedad de Chagas en Turbo, Antioquia. *Biomédica Rev del Inst Nac Salud* [Internet]. 2011;31:185–95. Available from: <http://search.scielo.org/resources/art-S0120-41572011000200005-col#.UIWoq4M-O3k.mendeley>

78. Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):659–88.
79. Rodrigues JCF, Godinho JLP, Souza W de. Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure. *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma.* 2014. p. 1–42.
80. Herrera L. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Bol Malariol y Salud Ambient.* 2010;50(1):3–15.
81. Bern C, Longo DL, Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med.* 2015;373(5):456–66.
82. Schenone H. Xenodiagnosis. *Memórias do Inst Oswaldo Cruz (Rio Janeiro).* 1999;94:289–94.
83. Azevedo Franco YB, Garcia I, Rassi A, Rodrigues AC, Rocha G, Garcia HH, et al. Correlação entre a positividade do xenodiagnóstico artificial e a quantidade de sangue e triatomíneos utilizados no exame , em pacientes chagásicos crônicos Correlation among the positivity of the artificial xenodiagnosis and the amount of blood and triat. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(1):29–33.
84. Britto C, Cardoso MA, Vanni C, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, et al. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology [Internet].* 1995;110 (Pt 3(1995):241–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7724232>
85. Umezawa ES, Franco Da Silveira J. Serological Diagnosis of Chagas Disease with Purified and Defined *Trypanosoma cruzi* Antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94(SUPPL. 1):285–8.
86. Umezawa ES, Souza AI, Pinedo-Cancino V, Marcondes M, Marcili A, Camargo LMA, et al. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. *Acta Trop.* 2009;111(1):15–20.
87. Ministerio de la Protección Social. Guía para la atención clínica integral del paciente con enfermedad de Chagas. Bogotá, República de Colombia: Ministerio de la Protección Social; 2010.
88. Ministerio de la Protección Social, Organización Mundial de la Salud, Instituto Nacional de Salud. Guía Para La Atención Clínica Integral Del Paciente Con Enfermedad De Chagas. *Inst Nac Salud.* 2010;82.
89. Flores MA, Trejos A, Paredes AR RA, Flores MA, Trejos A, Paredes AR. Strout's concentration method in the diagnosis of acute Chagas disease. *Bol Chil Parasitol.* 1966;21:38–9.
90. Bulcao Portela-Lindoso AA, Aparecida Shikanai-Yasuda M. Doença de Chagas crônica: Do xenodiagnóstico e hemocultura a reação em cadeia da polimerase. *Rev Saude Publica.* 2003;37(1):107–15.
91. Zulantay I, Apt W, Valencia C, Torres A, Saavedra M, Rodríguez J, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in untreated chronic chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(10):2224–6.
92. Chiari E. Chagas Disease Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction , Hemoculture

- and Serologic Methods. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro. 1999;94(113):299–300.
93. Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira a. C V, et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. J Clin Microbiol. 1996;34(9):2143–7.
 94. Guhl F, Jaramillo C, Carranza JC, Vallejo G a. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. Arch Med Res. 2002;33(4):362–70.
 95. Duarte L, Florez O, Rincon G, Gonzalez C. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. Colomb Med. 2014;45(2):61–6.
 96. Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: Value and limitations. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(SUPPL. 1):122–35.
 97. Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1977;71(3):217–25.
 98. Miles MA, Povia MM, De Souza AA, Lainson R, Shaw JJ, Ketteridge DS. Chagas's disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Parana State, north Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1981;75(5):667–74.
 99. Luquetti AO, Miles MA, Rassi A, de Rezende JM, de Souza AA, Povia MM, et al. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1986;80(3):462–70.
 100. Tibayrenc M, Miles MA. A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983;77(1):76–83.
 101. Mendonça MB a, Nehme NS, Santos SS, Cupolillo E, Vargas N, Junqueira A, et al. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. Parasitology. 2002;124(Pt 2):177–84.
 102. Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha a J, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980;77(11):6810–4.
 103. Vago a R, Macedo a M, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvão LM, et al. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. Am J Pathol. 1996;149(6):2153–9.
 104. Muñoz C, Solari A, APT W, Zulantay I. Caracterización de las Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* según sus marcadores moleculares. Ibero-Latinoamericana Parasitol. 2013;72(February 2016):5–21.
 105. Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. Mol Biochem Parasitol. 1989;33(3):205–14.
 106. Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. Mol Biochem Parasitol.

- 1993;62(1):45–52.
107. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell D a., Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996;83(2):141–52.
 108. Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC V, et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(6):807–11.
 109. ISRJ. Recommendations from a satellite meeting. Internartional Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of chagas disease, Rio de Janeiro,Brazil. 1999 p. 429–32.
 110. Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol.* 2000;30(1):35–44.
 111. Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;111(1):95–105.
 112. Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 2001;31(11):1218–26.
 113. Graham Clark C, Pung OJ. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;66(1):175–9.
 114. Herrera C, BARGUES MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, et al. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol.* 2007;7(4):535–9.
 115. Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop.* 2009;110(1):15–21.
 116. Herrera C, Guhl F, Falla A, Fajardo A, Gustavo Adolfo V, Montilla MM, et al. Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences. *J Parasitol Res.* 2009;2009:1–9.
 117. Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(6):1041–9.
 118. D'Ávila DA, Macedo AM, Valadares HMS, Gontijo ED, De Castro AM, Machado CR, et al. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1718–25.
 119. Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, et al. Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation. *Clin Infect Dis [Internet].* 2010;51(5):485–95. Available from: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/655680>
 120. Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Bisio M, Péneau J, Jimenez-Coello M, et al. Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma*

- cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015;9(5):e0003765. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003765>
121. Oliveira RP, Broude NE, Macedo a M, Cantor CR, Smith CL, Pena SD. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(7):3776–80.
 122. Valadares HMS, Pimenta JR, de Freitas JM, Duffy T, Bartholomeu DC, de Paula Oliveira R, et al. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly in infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. Int J Parasitol. 2008;38(7):839–50.
 123. Duque M, Ramírez JD, Rendón L, Guhl F. Evaluación de la variabilidad genética de aislamientos colombianos de *Trypanosoma cruzi* mediante marcadores microsatélites. Infectio. 2011;15(571):227–34.
 124. Llewellyn MS, Lewis MD, Acosta N, Yeo M, Carrasco HJ, Segovia M, et al. *Trypanosoma cruzi* IIc: Phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(9).
 125. Segovia M, Carrasco HJ, Martínez CE, Messenger LA, Nessi A, Londoño JC, et al. Epidemiologic Source Tracking of Orally Transmitted Chagas Disease, Venezuela. Epidemiol Source Track Chagas Dis. 2013;19(7):1098–101.
 126. Yeo M, Mauricio IL, Messenger LA, Lewis MD, Llewellyn MS, Acosta N, et al. Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(6).
 127. Carranza JC, Valadares HMS, D'Ávila DA, Baptista RP, Moreno M, Galvão LMC, et al. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. Int J Parasitol. 2009;39(9):963–73.
 128. Machado C a, Ayala FJ. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(13):7396–401.
 129. Lauthier JJ, Tomasini N, Barnabé C, Rumi MMM, D'Amato AMA, Ragone PG, et al. Candidate targets for Multilocus Sequence Typing of *Trypanosoma cruzi*: Validation using parasite stocks from the Chaco Region and a set of reference strains. Infect Genet Evol. 2012;12(2):350–8.
 130. Ramírez JD, Llewellyn MS. Response to Tibayrenc and Ayala: Reproductive clonality in protozoan pathogens - Truth or artefact? Molecular Ecology. 2015. p. 5782–4.
 131. Santalla J, Carrasco PO, Espinoza E, Rios T, Brutus L. Primer brote reportado de la enfermedad de chagas en la Amazonía Boliviana: reporte de 14 casos agudos por transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* en Guayaramerín, Beni-Bolivia First reported outbreak of Chagas disease in the Bolivian Amazonian zone: a r. Biofarbo. 2011;19(1):52–8.
 132. Bianchi F, Cucunubá Z, Guhl F, González NL, Freilij H, Nicholls RS, et al. Follow-up of an Asymptomatic Chagas Disease Population of Children after Treatment with Nifurtimox (Lampit) in a Sylvatic Endemic Transmission Area of Colombia. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015;9(2):e0003465. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003465>

133. Morillo C a., MArin-Neto J, A A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015;373(14):1–12.
134. Molina I, Salvador F, Sanchez-Montalva a. Posaconazole versus benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med [Internet].* 2014;371(10):966. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25184871>
135. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):e0004349.
136. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G. J. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today.* 2000;16(4):142–4.
137. Montalvo Alvarez AM, Nodarse JF, Goodridge IM, Fidalgo LM, Marin M, Van Der Auwera G, et al. Differentiation of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* using BccI for hsp70 PCR-RFLP. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104(5):364–7.
138. Kreutzer R, Corredor A, Grimaldi G, Grogl M, Rowton E, Young D, et al. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and Phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44(6):662–75.
139. Croan DG, Morrison D a, Ellis JT. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;89:149–59.
140. Zelazny AM, Fedorko DP, Li L, Neva FA, Fischer SH. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72(4):415–20.
141. Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, Sosa Cabrera T, Pérez-Montfort R, Becker I. Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res.* 2002;88(10):918–25.
142. Waki K, Dutta S, Ray D, Kolli BK, Akman L, Kawazu SI, et al. Transmembrane molecules for phylogenetic analyses of pathogenic protists: *Leishmania*-specific informative sites in hydrophilic loops of trans-endoplasmic reticulum N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase. *Eukaryot Cell.* 2007;6(2):198–210.
143. Asato Y, Oshiro M, Myint CK, Yamamoto Y, Kato H, Marco JD, et al. Phylogenic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. *Exp Parasitol [Internet].* Elsevier Inc.; 2009;121(4):352–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2008.12.013>
144. Myint CK, Asato Y, Yamamoto YI, Kato H, Bhutto AM, Soomro FR, et al. Polymorphisms of cytochrome b gene in *Leishmania* parasites and their relation to types of cutaneous leishmaniasis lesions in Pakistan. *J Dermatol.* 2008;35(2):76–85.
145. Van der Auwera G, Maes I, De Doncker S, Ravel C, Cnops L, Van Esbroeck M, et al. Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. *Euro Surveill.* 2013;18(30):20543.
146. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin J-C, Van der Auwera G. Phylogeny

- of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol.* 2010;10(2):238–45.
147. Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, de Souza W. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):8–11.
 148. McCall LI, McKerrow JH. Determinants of disease phenotype in trypanosomatid parasites. *Trends Parasitol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;30(7):342–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.05.001>
 149. Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin J-C, Soteriadou K, Dedet J-P, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(22):9375–80.
 150. El Baidouri F, Diancourt L, Berry V, Chevenet F, Pratlong F, Marty P, et al. Genetic Structure and Evolution of the *Leishmania* Genus in Africa and Eurasia: What Does MLSA Tell Us. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(6).
 151. Schönian G, Schnur L, El Fari M, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Köhler W, et al. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(2):217–24.
 152. Schwenkenbecher JM, Wirth T, Schnur LF, Jaffe CL, Schallig H, Al-Jawabreh A, et al. Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *Int J Parasitol.* 2006;36(2):237–46.
 153. Van Der Auwera G, Ravel C, Verweij JJ, Bart A, Schönian G, Felger I. Evaluation of four single-locus markers for leishmania species discrimination by sequencing. *J Clin Microbiol.* 2014;52(4):1098–104.
 154. Bañuls AL, Jonquieres R, Guerrini F, Le Pont F, Barrera C, Espinel I, et al. Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador: Are *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* distinct taxa? *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(5):838–45.
 155. Veland N, Boggild AK, Valencia C, Valencia BM, Llanos-Cuentas A, Van Der Auwera G, et al. *Leishmania (Viannia)* species identification on clinical samples from cutaneous leishmaniasis patients in Peru: Assessment of a molecular stepwise approach. *J Clin Microbiol.* 2012;50(2):495–8.
 156. Odiwuor S, Veland N, Maes I, Arévalo J, Dujardin JC, Van der Auwera G. Evolution of the *Leishmania braziliensis* species complex from amplified fragment length polymorphisms, and clinical implications. *Infect Genet Evol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;12(8):1994–2002. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.028>
 157. Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, Boshell J, Caceres E, Duque S, et al. Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;42(3):206–14.
 158. Ovalle CE, Porrás L, Rey M, Ríos M, Camargo YC. Distribución geográfica de especies de *Leishmania* aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta, E.S.E., 1995-2005. *Biomedica.* 2006;26(Supl. 1):145–51.
 159. Saravia NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct

- populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(1):86–94.
160. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012;7(5).
 161. Ferro C, López M, Fuya P, Lugo L, Cordovez JM, González C. Spatial distribution of sand fly vectors and eco-epidemiology of cutaneous leishmaniasis transmission in Colombia. *PLoS One.* 2015;10(10):1–16.
 162. Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Adv Parasitol.* 2007;64.
 163. Dey A, Singh S, Journal I, Microbiology M, Dey A, Singh S. 15/2/2016 Transfusion transmitted leishmaniasis: A case report and review of literature. *Indian Journal of Medical Microbiology.* *Indian J Med Microbiol.* 2016;24(3):1–8.
 164. Pagliano P, Carannante N, Rossi M, Gramiccia M, Gradoni L, Faella FS, et al. Visceral leishmaniasis in pregnancy: A case series and a systematic review of the literature. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(2):229–33.
 165. Turchetti AP, Souza TD, Paixo TA, Santos RL. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(4):403–7.
 166. Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, et al. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(4).
 167. Mescouto-Borges MRM, Maus M, Costa DL, da Silva Pranchevicius MC, Romero GAS. Congenitally transmitted visceral leishmaniasis: Report of two Brazilian human cases. *Brazilian J Infect Dis [Internet]. Elsevier Editora Ltda;* 2013;17(2):263–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.10.017>
 168. Naucke TJ, Lorentz S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors [Internet]. BioMed Central Ltd;* 2012;5(1):67. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3350385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 169. Alexander B, Agudelo LA, Navarro JF, Ruiz JF, Molina J, Aguilera G, et al. Relationship between coffee cultivation practices in Colombia and exposure to infection with *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(12):1263–8.
 170. Valderrama-Ardila C, Alexander N, Ferro C, Cadena H, Martín D, Holford TR, et al. Environmental risk factors for the incidence of American cutaneous leishmaniasis in a sub-andean zone of Colombia (Chaparral, Tolima). *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(2):243–50.
 171. Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(5):305–18.
 172. Marques MJ, Volpini AC, Genaro O, Mayrink W, Romanha AJ. Simple form of clinical sample preservation and leishmania DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65(6):902–6.
 173. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR

- assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2006;44(4):1435–9.
174. Chargui N, Bastien P, Kallel K, Haouas N, Akrouf FM, Masmoudi A, et al. Usefulness of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005;99(10):762–8.
 175. Kumar R, Bumb RA, Ansari NA, Mehta RD, Salotra P. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Bikaner, India: Parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(5):896–901.
 176. Garcia AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(4):368–71.
 177. Deborggraeve S, Laurent T, Espinosa D, Van der Auwera G, Mbuchi M, Wasunna M, et al. A simplified and standardized polymerase chain reaction format for the diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2008;198(10):1565–72.
 178. Boggild AK, Valencia BM, Espinosa D, Veland N, Ramos AP, Arevalo J, et al. Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filter paper lesion impressions for patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2010;50(1):e1–6.
 179. Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, et al. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8(4):828–31.
 180. Wortmann G, Hochberg L, Houg HH, Sweeney C, Zapor M, Aronson N, et al. Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(6):999–1004.
 181. Adams ER, Gomez MA, Scheske L, Rios R, Marquez R, Cossio A, et al. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. *Parasitology.* 2014;141(14):1891–7.
 182. Jara M, Aduai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: Exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol.* 2013;51(6):1826–33.
 183. Castilho TM, Marcelo L, Camargo A, McMahon-pratt D, Shaw JJ, Floeter-winter LM. A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Identification and Quantification of American *Leishmania* Species on the Basis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Trop Med.* 2008;78(101):122–32.
 184. Schulz A, Mellenthin K, Scho G, Fleischer B, Drosten C. Detection, Differentiation, and Quantitation of Pathogenic. *Society.* 2003;41(4):1529–35.
 185. Ghasemian M, Gharavi MJ, Akhlaghi L, Mohebali M, Meamar AR, Aryan E, et al. Development and Assessment of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis in Iran. *Iran J Parasitol.* 2014;9(1):50–9.
 186. Karani M, Sotiriadou I, Plutzer J, Karanis P. Bench-scale experiments for the development of a unified loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for

- the in vitro diagnosis of *Leishmania* species' promastigotes. *Epidemiol Infect.* 2014;142(8):1671–7.
187. Takagi H, Itoh M, Islam MZ, Razzaque A, Ekram a RMS, Hashighuchi Y, et al. Sensitive, specific, and rapid detection of *Leishmania donovani* DNA by loop-mediated isothermal amplification. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(4):578–82.
 188. Verma S, Avishek K, Sharma V, Negi NS, Ramesh V, Salotra P. Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75(4):390–5.
 189. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;47(1):349–58.
 190. Nasereddin A, Bensoussan-Hermano E, Schönian G, Baneth G, Jaffe CL. Molecular diagnosis of old world cutaneous leishmaniasis and species identification by use of a reverse line blot hybridization assay. *J Clin Microbiol.* 2008;46(9):2848–55.
 191. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck H, Felger I. Identification and Differentiation of. *Society.* 2003;41(7):3147–53.
 192. Castilho TM, Shaw JJ, Lucile M, Floeter-Winter LM. New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of *Leishmania* Species. *J Clin Microbiol.* 2003;41(2):540–6.
 193. Guerbouj S, Victoir K, Guizani I, Seridi N, Nuwayri-Salti N, Belkaid M, et al. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? *Parasitology.* 2001;122 Pt 1:25–35.
 194. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-cuentas A, Doncker S De, Arevalo J, et al. Culture-Independent Species Typing of Neotropical. *Society.* 2004;42(5):2294–7.
 195. da Silva LA, de Sousa C d S, da Gracca GC, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol.* 2010;10(1):77–83.
 196. Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schönian G, Töz SÖ, Jaffe CL, et al. Detection and identification of old world leishmania by high resolution melt analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(1):4–8.
 197. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1997;245(2):154–60.
 198. Applied Biosystems. A Guide to High Resolution Melting (HRM). 2009.
 199. Foulet F, Botterel F, Buffet P, Morizot G, Rivollet D, Deniau M, et al. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the cytochrome b gene. *J Clin Microbiol.* 2007;45(7):2110–5.
 200. Luyo-Acero GE, Uezato H, Oshiro M, Takei K, Kariya K, Katakura K, et al. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology* [Internet]. 2004;128(Pt 5):483–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15180316>

201. Marco JD, Bhutto AM, Soomro FR, Baloch JH, Barroso PA, Kato H, et al. Multilocus enzyme electrophoresis and cytochrome B gene sequencing-based identification of *Leishmania* isolates from different foci of cutaneous leishmaniasis in Pakistan. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(2):261–6.
202. Kato H, Cáceres AG, Gomez EA, Mimori T, Uezato H, Marco JD, et al. Short report: Molecular mass screening to incriminate sand fly vectors of Andean-type cutaneous leishmaniasis in Ecuador and Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(5):719–21.
203. Yang B-B, Chen D-L, Chen J-P, Liao L, Hu X-S, Xu J-N. Analysis of kinetoplast cytochrome b gene of 16 *Leishmania* isolates from different foci of China: different species of *Leishmania* in China and their phylogenetic inference. *Parasit Vectors* [Internet]. *Parasites & Vectors*; 2013;6(1):32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3573894&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
204. Marco JD, Uezato H, Mimori T, Barroso PA, Korenaga M, Nonaka S, et al. Are cytochrome B gene sequencing and polymorphism-specific polymerase chain reaction as reliable as multilocus enzyme electrophoresis for identifying *Leishmania* spp. from Argentina? *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(2):256–60.
205. Jamjoom MB, Ashford RW, Bates P a, Kemp SJ, Noyes H a. Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Ann Trop Med Parasitol* [Internet]. 2002;96(3):265–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12061973>
206. Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Presber W, Schönian G. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):495–503.
207. Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology.* 2011;138(4):405–25.
208. Zemanová E, Jirků M, Mauricio IL, Horák A, Miles MA, Lukeš J. The *Leishmania donovani* complex: Genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. *Int J Parasitol.* 2007;37(2):149–60.
209. Tsukayama P, Lucas C, Bacon DJ. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*. *Int J Parasitol* [Internet]. Australian Society for Parasitology Inc.; 2009;39(3):355–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.08.004>
210. Soto J, Arana B a, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2004;38(9):1266–72.
211. Soto J, Toledo J, Vega J, Berman J. Short report: Efficacy of pentavalent antimony for treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72(4):421–2.
212. Soto J, Soto P. Estado actual y futuro de la terapia anti-leishmaniásica en Colombia. 2006;26:194–206.
213. Arevalo J, Ramirez L, Aduai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, et al. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in

- patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2007;195(12):1846–51.
214. Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L, et al. Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2008;46(2):223–31. Available from: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/524042>
 215. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, Oliveira-Neto MPMPDMP, Brito MEF, Falqueto A, et al. Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3126–32.
 216. Mauricio IL, Yeo M, Baghaei M, Doto D, Pratlong F, Zemanova E, et al. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: Resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int J Parasitol.* 2006;36(7):757–69.
 217. Mauricio IL, Stothard JR, Miles M a. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today.* 2000;16(5):188–9.
 218. Martin-Sanchez J, Guilvard E, Acedo-Sanchez C, Wolf-Echeverri M, Sanchiz-Marin MC, Morillas-Marquez F. *Phlebotomus perniciosus* newstead, 1911, infection by various zymodemes of the *Leishmania infantum* complex in the Granada province (Southern Spain). *Int J Parasitol.* 1994;24(3):405–8.
 219. Ferro C, Morrison a C, Torres M, Pardo R, Wilson ML, Tesh RB. Age structure, blood-feeding behavior, and *Leishmania chagasi* infection in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J Med Entomol.* 1995;32(5):618–29.
 220. Rotureau B. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(1):81–96.
 221. Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. Measuring the burden of neglected tropical diseases: The global burden of disease framework. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007;1(2).
 222. Peña VH, Fernández GJ, Gómez-Palacio AM, Mejía-Jaramillo AM, Cantillo O, Triana-Chávez O. High-resolution melting (HRM) of the cytochrome B gene: A powerful approach to identify blood-meal sources in Chagas disease vectors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(2).
 223. Hajian-Tilaki K. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. *J Biomed Inform.* 2014 Apr;48:193–204.
 224. López MC, Duque Beltrán S, Orozco Vargas LC, Camargo D, Gualdrón LE, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infección chagásica por ELISA. *Biomédica, Rev del Inst Nac Salud.* 1999;19(2):159–63.
 225. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI. Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases ; Approved Guideline — Second Edition. 2010 p. 80.
 226. Melo MF, Moreira OC, Tenório P, Lorena V, Lorena-Rezende I, Júnior WO, et al. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasit Vectors* [Internet]. 2015;8:154. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4369093&tool=pmcentre>

- z&rendertype=abstract
227. León CM, Hernández C, Montilla M, Ramírez JD. Retrospective distribution of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2015;110(3):387–93. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000300387&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 228. Villa LM, Guhl F, Zabala D, Ramírez JD, Urrea DA, Hernández DC, et al. The identification of two *Trypanosoma cruzi* I genotypes from domestic and sylvatic transmission cycles in Colombia based on a single polymerase chain reaction amplification of the spliced-leader intergenic region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(7):932–5.
 229. Hernández C, Cucunubá Z, Parra E, Toro G, Zambrano P, Ramírez JD. Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) and HIV co-infection in Colombia. Int J Infect Dis [Internet]. 2014;26:146–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971214014969>
 230. de Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Zavala-Jaspe R, Abate T, Contreras R, et al. The performance of laboratory tests in the management of a large outbreak of orally transmitted Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107(7):893–8.
 231. Souza-Lima R de C, Barbosa M das GV, Coura JR, Arcanjo ARL, Nascimento A da S, Ferreira JMBB, et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46(4):510–4.
 232. Blanchet D, Brenière SF, Schijman AG, Bisio M, Simon S, Véron V, et al. First report of a family outbreak of Chagas disease in French Guiana and posttreatment follow-up. Infect Genet Evol [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;28:245–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25448161>
 233. Lana M De, Lopes L a, Martins HR, Bahia MT, Machado-de-Assis GF, Wendling AP, et al. Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2009;104(8):1139–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20140375>
 234. Lacunza CD, Negrette OS, Mora MC, García Bustos MF, Basombrío MÁ. Uso de la reacción en cadena de la polimerasa para el control terapéutico de la infección crónica por *Trypanosoma cruzi*. Rev Patol Trop [Internet]. 2015;44(1):21–32. Available from: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/34815>
 235. Flávia Nardy A, Freire-de-Lima CG, Morrot A. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*. J Immunol Res. 2015;2015:178947.
 236. Bustamante JM, Novarese M, Rivarola HW, Lo Presti MS, Fernández AR, Enders JE, et al. Reinfections and *Trypanosoma cruzi* strains can determine the prognosis of the chronic chagasic cardiopathy in mice. Parasitol Res. 2007;100(6):1407–10.
 237. Castro a M, Luquetti a O, Rassi a, Rassi GG, Chiari E, Galvão LMC. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 2002;88:894–900.
 238. Elias MCQB, Vargas NS, Zingales B, Schenkman S. Organization of satellite DNA in

- the genome of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 2003;129(1):1–9.
239. Martins C, Baptista CS, Ienne S, Cerqueira GC, Bartholomeu DC, Zingales B. Genomic organization and transcription analysis of the 195-bp satellite DNA in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol [Internet]. 2008;160(1):60–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166685108000674>
 240. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(4).
 241. Solari A, Ortíz S, Soto A, Arancibia C, Campillay R, Contreras M, et al. JAC Treatment of *Trypanosoma cruzi* -infected children with nifurtimox : a 3 year follow-up by PCR. 2001;515–9.
 242. Murcia L, Carrilero B, Muñoz MJ, Iborra MA, Segovia M. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2010;65(8):1759–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542903>
 243. Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, et al. Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. N Engl J Med [Internet]. 2014;370(20):1899–908. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1313122>
 244. Rumi MMM, Pérez Brandán C, Gil JF, D'Amato a. MA, Ragone PG, Lauthier JJ, et al. Benznidazole treatment in chronic children infected with *Trypanosoma cruzi*: Serological and molecular follow-up of patients and identification of Discrete Typing Units. Acta Trop [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;128(1):130–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.07.003>
 245. FLORES-CHAVEZ M, BOSSENO MF, BASTRENTA B, ALCAZAR DALENZ JL, HONTEBEYRIE M, REVOLLO S, et al. Polymerase Chain Reaction Detection and Serologic Follow-Up After Treatment With Benznidazole in Bolivian Children Infected With a Natural Mixture of *Trypanosoma cruzi* I and II. Am J Trop Med Hyg. 2006;75(3):497–501.
 246. Galvão LMC, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA, Andrade ALSS. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. J Clin Microbiol [Internet]. 2003;41(11):5066–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=262508&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 247. Gonzalez A, Prediger E, Huecas MEME, Nogueirat N, Lizardi PMPM, Nogueira N, et al. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81:3356–60.
 248. Sales-Campos H, Kappel HB, Andrade CP, Lima TP, Castilho A de, Giraldo LER, et al. *Trypanosoma cruzi* DTU TcII presents higher blood parasitism than DTU TcI in an experimental model of mixed infection. Acta Parasitol [Internet]. 2015;60(3):435–41. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/ap.2015.60.issue-3/ap-2015-0060/ap-2015-0060.xml>
 249. Nicholls RS, Cucunubá Pérez ZM, Knudson a, Flórez AC, Montilla M, Puerta Bula

- CJ, et al. Enfermedad de Chagas aguda en Colombia, una entidad poco sospechada. Informe de 10 casos presentados en el periodo 2002 a 2005. *Biomédica Rev del Inst Nac Salud* [Internet]. 2005;25:115. Available from: <http://search.scielo.org/resources/art-S0120-41572007000500002-col#.UIWpLr9TCbc.mendeley>
250. Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira ACV, Silva FM da, Pinto AY das N, et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol* [Internet]. Australian Society for Parasitology Inc.; 2009;39(5):615–23. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751908004086>
 251. Valente SADS, da Costa Valente V, das Neves Pinto AY, de Jesus Barbosa César M, dos Santos MP, Miranda COS, et al. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103(3):291–7.
 252. Ramírez JD, Duque MC, Montilla M, Cucunubá Z, Guhl F. Natural and emergent *Trypanosoma cruzi* I genotypes revealed by mitochondrial (Cytb) and nuclear (SSU rDNA) genetic markers. *Exp Parasitol.* 2012;132:487–94.
 253. Cruz L, Vivas A, Montilla M, Hernández C, Flórez C, Parra E, et al. Comparative study of the biological properties of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in a murine experimental model. *Infect Genet Evol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;29:110–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134814004158>
 254. Coura JR, de Abreu LL, Willcox HP, Petana W. [Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas' disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997 Apr;30(2):139–44.
 255. Machado-de-Assis GF, Silva AR, Do Bem VAL, Bahia MT, Martins-Filho OA, Dias JCP, et al. Posttherapeutic cure criteria in chagas' disease: conventional serology followed by supplementary serological, parasitological, and molecular tests. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(8):1283–91.
 256. Machado-de-Assis GF, Diniz GA, Montoya RA, Dias JCP, Coura JR, Machado-Coelho GLL, et al. A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(7):873–80.
 257. Jackson Y, Chatelain E, Mauris A, Holst M, Miao Q, Chappuis F, et al. Serological and parasitological response in chronic Chagas patients 3 years after nifurtimox treatment. *BMC Infect Dis.* 2013;13:85.
 258. Muñoz C, Zulantay I, Apt W, Ortiz S, Schijman AG, Bisio M, et al. Evaluation of nifurtimox treatment of chronic chagas disease by means of several parasitological methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(9):4518–23.
 259. Estani SS, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(4):526–9.
 260. Cançado JR. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with

- benznidazole. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2002;44(1):29–37.
261. Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, et al. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. J Antimicrob Chemother. 2003;52(3):441–9.
 262. Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: Clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. Am Heart J. 1994;127(1):151–62.
 263. Sosa-Estani S, Viotti R, Segura EL. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: Insight gained in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(SUPPL. 1):167–80.
 264. Fabbro DL, Streiger ML, Arias ED, Bizai ML, Del Barco M, Amicone NA. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe City (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: Parasitological, serological and clinical evolution. Rev Soc Bras Med Trop. 2007 Feb;40(1):1–10.
 265. Lacunza CD, Negrete OS, Mora MC. Use of the polymerase chain reaction (PCR) for early evaluation of etiological treatment in young adults , chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Patol Trop. 2006;35(4400):227–32.
 266. Meira WSF, Castro AM De, Gontijo ED, Rassi A, Alejandro O, Machado-coelho GLL, et al. Avaliação dos testes de Hemocultura , Lise Mediada pelo Complemento e Realção em Cadeia da Polimerase na verificação de eficácia terapêutica na doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(Suplemento III):107–9.
 267. Aguiar C, Batista AM, Pavan TBS, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, et al. Serological profiles and evaluation of parasitaemia by PCR and blood culture in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. Trop Med Int Heal. 2012;17(3):368–73.
 268. Braga MS, Lauria-Pires L, Argañaraz ER, Nascimento RJ, Teixeira ARL. Persistent infections in chronic chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2000;42(3):157–61.
 269. Fernandes CD, Tiecher FM, Balbinot MM, Liarte DB, Scholl D, Steindel M, et al. Efficacy of benznidazole treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(1):27–32.
 270. Andrade SG, Magalhaes JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. Bull World Health Organ. 1985;63(4):721–6.
 271. Mejía-Jaramillo AM, Fernández GJ, Montilla M, Nicholls RS, Triana-Chávez O. Sensibilidad al benznidazole de cepas de *Trypanosoma cruzi* sugiere la circulación de cepas naturalmente resistentes en Colombia. Biomédica, Rev del Inst Nac Salud [Internet]. 2012;32(2):196–205.
 272. Campos RF, Guerreiro MLS, De Souza Castro Sobral K, Cunha Lima RDCP, Andrade SG. Response to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the 21SF strain of *Trypanosoma cruzi* (biotype Type II, *Trypanosoma cruzi* II). Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38(2):142–6.
 273. Teston APM, Monteiro WM, Reis D, Bossolani GDP, Gomes ML, de Araújo SM, et

- al. In vivo susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. *Trop Med Int Heal*. 2013;18(1):85–95.
274. Uehara LA, Moreira OC, Oliveira AC, Azambuja P, Lima APCA, Britto C, et al. Cruzipain Promotes *Trypanosoma cruzi* Adhesion to *Rhodnius prolixus* Midgut. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12).
275. Gómez-Melendro EN, Hernández C, González-Urbe C, Brochero H. First Record of *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera: Reduviidae: Triatomini) in the Municipality of Riohacha, La Guajira Colombia. *Front Public Heal*. 2014;2(219):1–9.
276. Deane MP, Lenzi HL, Jansen A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1984. p. 513–5.
277. Cantillo-Barraza O, Garcés E, Gómez-Palacio A, Cortés LA, Pereira A, Marcet PL, et al. Eco-epidemiological study of an endemic Chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae), dogs and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance. *Parasit Vectors* [Internet]. 2015;8(1):482.
278. Cantillo-Barraza O, Chaverra D, Marcet P, Arboleda-Sánchez S, Triana-Chávez O. *Trypanosoma cruzi* transmission in a Colombian Caribbean region suggests that secondary vectors play an important epidemiological role. *Parasit Vectors* [Internet]. 2014;7(1):381. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/381>
279. Luitgards-Moura JF, Vargas AB, Almeida CE, Magno-Esperança G, Agapito-Souza R, Folly-Ramos E, et al. A *Triatoma maculata* (hemiptera, reduviidae, triatominae) population from Roraima, Amazon Region, Brazil, has some bionomic characteristics of a potential Chagas disease vector. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005;47(3):131–7.
280. García-Alzate R, Lozano-Arias D, Reyes-Lugo RM, Morocoima A, Herrera L, Mendoza-León A. *Triatoma maculata*, the Vector of *Trypanosoma cruzi*, in Venezuela. Phenotypic and Genotypic Variability as Potential Indicator of Vector Displacement into the Domestic Habitat. *Front public Heal* [Internet]. 2014;2(September):170. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4179684&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
281. Rojas ME, Várquez P, Villarreal MF, Velandia C, Vergara L, Morán-Borges YH, et al. An entomological and seroepidemiological study of Chagas' disease in an area in central-western Venezuela infested with *Triatoma maculata* (Erichson 1848). *Cad saude publica / Minist da Saude, Fund Oswaldo Cruz, Esc Nac Saude Publica*. 2008;24(10):2323–33.
282. Espinola H, Rodríguez M d. BRT. Informaciones sobre la biología y el ciclo de vida de *Triatoma maculata* (Erichson,1848)(Hemiptera,Reduviidae,Triatominae),en condiciones de laboratorio. *BolDirMalariolSanAmb*. 1981;21:141–2.
283. Tonn R, Otero E, Mora H, R.Carcavallo. Aspectos biológicos,ecológicos y distribución geográfica de *Triatoma maculata* (Erichson,1848), (Hemiptera,Reduviidae),en Venezuela. *BolDir MalariolSanAmb*. 1978;18:16–24.
284. Feliciangeli M, Rabinovich J. Vital statistics of triatominae

- (Hemiptera:Reduviidae)under laboratory conditions. J Med Entomol. 1985;22:43–8.
285. Luitgards-Moura JF, Borges-Pereira J, Costa J, Zauza PL, Rosa-Freitas MG. On the possibility of autochthonous chagas disease in Roraima, Amazon Region, Brazil, 2000-2001. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2005;47(1):45–54.
 286. Escalante ME, Gomez D, Silvera LA, Sánchez G, Venegas J. Detection of high percentage of *Trypanosoma cruzi* infection, the etiologic agent of Chagas disease, in wild populations of Colombian Caribbean triatomines. Acta Parasitol. 2015;60(2):315–21.
 287. Patterson JS, Barbosa SE, Feliciangeli MD. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: Evolution, ecology and epidemiological significance. Acta Trop. 2009;110(2–3):187–99.
 288. Angulo VM, Esteban L, Luna KP. *Attalea butyracea* próximas a las viviendas como posible fuente de infestación domiciliaria por *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) en los Llanos Orientales de Colombia. Biomédica. 2012;32(2):277–85.
 289. Serrano O, Mendoza F, Suárez B, Soto A. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en dos localidades del municipio Costa de Oro, Estado de Aragua, Venezuela. Biomédica Rev Del Inst Nac Salud [Internet]. 2008;28(1):108–15. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mnh&AN=18645666&lang=es&site=ehost-live>
 290. Maeda FY, Cortez C, Alves RM, Yoshida N. Mammalian cell invasion by closely related *Trypanosoma* species *T. dionisii* and *T. cruzi*. Acta Trop [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;121(2):141–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.017>
 291. Reyes-lugo M. *Panstrongylus geniculatus* Latreille 1811 (Hemiptera : Reduviidae : Triatominae), vector de la enfermedad de Chagas en el ambiente domiciliario del centro-norte de Venezuela. Medicina (B Aires). 2009;20(3):180–205.
 292. Valente VC, Valente SA, Noireau F, Carrasco HJ, Miles MA. Chagas disease in the Amazon Basin: association of *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) with domestic pigs. J Med Entomol [Internet]. 1998;35(2):99–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9538568>
 293. Feliciangeli MD, Carrasco H, Patterson JS, Suarez B, Martínez C, Medina M. Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 and *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811, vector incrimination, and seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* among inhabitants in El Guamito, Lara State, Venezuela. Am J Trop Med Hyg. 2004;71(4):501–5.
 294. Carrasco HJ, Torrellas A, García C, Segovia M, Feliciangeli MD. Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. Int J Parasitol. 2005;35(13):1379–84.
 295. Carrasco HJ, Segovia M, Londoño JC, Ortegoza J, Rodríguez M, Martínez CE. *Panstrongylus geniculatus* and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: high risk factors for Chagas' disease transmission in the Metropolitan District of Caracas, Venezuela. Parasit Vectors [Internet]. 2014;7(1):1003–28. Available from: [10.1186/s13071-014-0602-](https://doi.org/10.1186/s13071-014-0602-)

- 7%5Cnhttp://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=100343600&lang=es&site=ehost-live
296. Maestre-Serrano R, Eyes-Escalante M. Actualización de la presencia y distribución de triatominos en el departamento del Atlántico-Colombia: 2003-2010. *Bol Malariol y Salud Ambient.* 2012;52(1):125–8.
 297. Jácome-Pinilla D, Hincapie-Peñaloza E, Ortiz MI, Ramírez JD, Guhl F, Molina J. Risks associated with dispersive nocturnal flights of sylvatic Triatominae to artificial lights in a model house in the northeastern plains of Colombia. *Parasit Vectors* [Internet]. *Parasites & Vectors*; 2015;8(1):600. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/600>
 298. de Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A, et al. Update on oral chagas disease outbreaks in Venezuela: Epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(3):377–86.
 299. Molinari J, Aldana E, Nassar JM. *Panstrongylus geniculatus* (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae): Natural infection with *Trypanosoma cruzi* under cavernicolous conditions in Paraguaná Peninsula, Venezuela. *J Cave Karst Stud.* 2007;69(2):285–7.
 300. Aldana E, Heredia-Coronado E, Avendaño-Rangel F, Lizano E, Concepción JL, Bonfante-Cabarcas R, et al. Morphometric analysis of *Panstrongylus geniculatus* (Heteroptera: Reduviidae) from Caracas City, Venezuela. *Biomédica* [Internet]. 2011;31:108–17. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572011000100013&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 301. Hurtado LA, Calzada JE, Pineda V, González K, Santamaría AM, Cáceres L, et al. Conocimientos y factores de riesgo relacionados con la enfermedad de Chagas en dos comunidades panameñas donde *Rhodnius pallescens* es el vector principal. *Biomédica* [Internet]. 2014;34:260–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.2133>
 302. Gottdenker NL, Chaves LF, Calzada JE, Saldaña A, Carroll CR. Host Life History Strategy, Species Diversity, and Habitat Influence *Trypanosoma cruzi* Vector Infection in Changing Landscapes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(11):5–7.
 303. Zeledón R, Marín F, Calvo N, Lugo E, Valle S. Distribution and ecological aspects of *Rhodnius pallescens* in Costa Rica and Nicaragua and their epidemiological implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(1):75–9.
 304. Calzada JE, Pineda V, Montalvo E, Alvarez D, Santamaría AM, Samudio F, et al. Human trypanosome infection and the presence of intradomicile *Rhodnius pallescens* in the western border of the Panama Canal, Panama. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(5):762–5.
 305. Cantillo-Barraza O, Gómez-Palacio A, Salazar D, Mejía-Jaramillo AM, Calle J, Triana O. [Distribution and ecoepidemiology of the triatomine fauna (Hemiptera: Reduviidae) in Margarita Island, Bolívar, Colombia]. *Biomedica* [Internet]. 2010;30(3):382–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21713340>
 306. Jaramillo N, Schofield CJ, Gorla D, Caro-Riaño H, Moreno J, Mejía E, et al. The Role

- of *Rhodnius pallescens* as a vector of Chagas disease in Colombia and Panama. *Res Rev Parasitol.* 2000;60(3–4):75–82.
307. Parra-henao G, Angulo V, Jaramillo N, Restrepo M. Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. Aspectos epidemiológicos, entomológicos y de distribución. *Rev CES Med.* 2009;23(1):17–26.
 308. Romaña CA, Pizarro JC, Rodas E, E G. Palm trees as ecological indicators of risk areas for Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93(January 2016):594–5.
 309. Pineda V, Montalvo E, Alvarez D, Santamaría AM, Calzada JE, Saldaña A. Feeding sources and trypanosome infection index of *Rhodnius pallescens* in a Chagas disease endemic area of Amador County, Panama. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008;50(2):113–6.
 310. Pipkin AC. Domiciliary Reduviid Bugs And The Epidemiology Of Chagas' Disease In Panama (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *J Med Entomol* [Internet]. 1968;5(1):107–24. Available from: <http://jme.oxfordjournals.org/content/5/1/107.abstract>
 311. De Vasquez AM, Samudio FE, Saldaña A, Paz HM, Calzada JE. Eco-epidemiological aspects of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and their vector (*Rhodnius pallescens*) in Panama. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004;46(4):217–22.
 312. Alarcón BDN, Díaz-bello Z, Colmenares C, Zavala-jaspe R. Transmisión urbana de la enfermedad de Chagas en Caracas , Venezuela : aspectos epidemiológicos , clínicos y de laboratorio. *Medicina (B Aires).* 2009;20(3):158–64.
 313. Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* 2010;201(9):1308–15.
 314. Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JC, et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.* 1991. p. 351–7.
 315. Díaz ML, Leal S, Mantilla JC, Molina-Berrios A, López-Muñoz R, Solari A, et al. Acute chagas outbreaks: molecular and biological features of *Trypanosoma cruzi* isolates, and clinical aspects of acute cases in Santander, Colombia. *Parasit Vectors* [Internet]. *Parasites & Vectors;* 2015;8(1):608. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/608>
 316. Díaz-Bello Z, Thomas MC, López MC, Zavala-Jaspe R, Noya O, DE Noya BA, et al. *Trypanosoma cruzi* genotyping supports a common source of infection in a school-related oral outbreak of acute Chagas disease in Venezuela. *Epidemiol Infect* [Internet]. 2014;142(1):156–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23544849>
 317. Muñoz-Calderón a., Díaz-Bello Z, Valladares B, Noya O, López MC, Alarcón de Noya B, et al. Oral transmission of Chagas disease: Typing of *Trypanosoma cruzi* from five outbreaks occurred in Venezuela shows multiclonal and common infections in patients, vectors and reservoirs. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2013;17:113–22.
 318. Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina

- State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;60(1):25–32.
319. Andrade SG, Campos RF, Steindel M, Guerreiro ML, Magalhães JB, de Almeida MC, et al. Biological, biochemical and molecular features of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients infected through oral transmission during a 2005 outbreak in the state of Santa Catarina, Brazil: Its correspondence with the new *T. cruzi* taxonomy consensu. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(8):948–56.
 320. Nobrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of chagas disease by consumption of Acai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(4):653–5.
 321. Dias JP, Bastos C, Araujo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F, et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(3):296–300.
 322. Barbosa RL, Dias VL, Pereira KS, Schmidt FL, Franco RMB, Guaraldo AMA, et al. Survival In Vitro and Virulence of *Trypanosoma cruzi* in Açai Pulp in Experimental Acute Chagas Disease. *J Food Prot*. 2012;75(3):601–6.
 323. Suárez DC, Rey ÁP, Orduz ML, Prada RL, Tarazona Z. Supervivencia de *Trypanosoma cruzi* en bebidas experimentalmente contaminadas. *Biomédica, Rev del Inst Nac Salud* [Internet]. 2012;32(1):134–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23235795>
 324. Cardoso AVN, Lescano SAZ, Amato Neto V, Gakiya É, Santos S V. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006;48(5):287–9.
 325. Nicholls RS, Cucunubá ZM, Knudson A, Flórez AC, Montilla M, Puerta CJ, et al. Acute Chagas disease in Colombia: a rarely suspected disease. Report of 10 cases presented during the 2002-2005 period. *Biomedica*. 2007;27 Suppl 1:8–17.
 326. Marsden P, Hagstrom J. *Trypanosoma cruzi* in the saliva of beagle puppies. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1966;60(2):189–91.
 327. Beltrão H de BM, Cerroni M de P, Freitas DRC de, Pinto AY das N, Valente V da C, Valente SA, et al. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007. *Trop Doct*. 2009;39(4):231–2.
 328. El Tai N, Osman O, El Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94(5):575–9.
 329. da Gracca GC, Volpini AC, Romero GAS, Neto MP de O, Hueb M, Porrozzi R, et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(5):664–74.
 330. Cruz I, Millet A, Carrillo E, Chenik M, Salotra P, Verma S, et al. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2013;134(3):281–9.
 331. Roelfsema JH, Nozari N, Herremans T, Kortbeek LM, Pinelli E. Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of

- Leishmania* patients. *Exp Parasitol.* 2011;127(1):36–41.
332. Hernández C, Alvarez C, González C, Ayala MS, León CM, Ramírez JD. Identification of Six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors* [Internet]. 2014;7(1):501. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4239372&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 333. Higuera SL, Guhl F, Ramírez JD. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasit Vectors* [Internet]. 2013;6:112. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3641988&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 334. Tong SYC, Xie S, Richardson LJ, Ballard SA, Dakh F, Grabsch EA, et al. High-resolution melting genotyping of enterococcus faecium based on multilocus sequence typing derived single nucleotide polymorphisms. *PLoS One.* 2011;6(12).
 335. Goldschmidt P, Degorge S, Benallaoua D, Semoun O, Borsali E, Le Bouter A, et al. New strategy for rapid diagnosis and characterization of keratomycosis. *Ophthalmology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;119(5):945–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.10.038>
 336. Costa JM, Cabaret O, Moukoury S, Bretagne S. Genotyping of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* using high-resolution melting analysis of the repeated B1 gene. *J Microbiol Methods* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;86(3):357–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.017>
 337. Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. Detection and characterization of *Leishmania (Leishmania) and Leishmania (Viannia)* by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. *PLoS One.* 2014;9(2).
 338. Baneth G, Zivotofsky D, Nachum-Biala Y, Yasur-Landau D, Botero A-M. Mucocutaneous *Leishmania tropica* infection in a dog from a human cutaneous leishmaniasis focus. *Parasit Vectors* [Internet]. 2014;7:118. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3987837&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 339. Nasereddin A, Jaffe CL. Rapid diagnosis of old world leishmaniasis by high-resolution melting analysis of the 7sl RNA gene. *J Clin Microbiol.* 2010;48(6):2240–2.
 340. Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BA, Moreira OC, et al. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2012;5(1):15. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/15>
 341. Montalvo a M, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology.* 2010;137(8):1159–68.
 342. Cruz-Barrera ML, Ovalle-Bracho C, Ortegón-Vergara V, Pérez-Franco JE, Echeverry

- MC. Improving *Leishmania* species identification in different types of samples from cutaneous lesions. *J Clin Microbiol*. 2015;53(4):1339–41.
343. Schonian G, Mauricio I, Cupolillo E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol*. 2010;26(10):466–9.
344. D A ME. M Araua1S233, D. A. Evans', A. Zolessi', A. Llanos Cuentas''' and J. Arevalo'p2F4'. 1990;526–9.
345. Urbano J, Ovalle CE, Rosales MJ, Camargo YC, Gutiérrez-Sánchez R, Marín C. Characterization of cutaneous isolates of *Leishmania* in Colombia by isoenzyme typing and kDNA restriction analysis. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol*. 2011;70(March):16–24.
346. Jafari R, Najafzadeh N, Sedaghat MM, Parvizi P. Molecular characterization of sandflies and *Leishmania* detection in main vector of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Abarkouh district of Yazd province, Iran. *Asian Pac J Trop Med [Internet]*. Hainan Medical College; 2013;6(10):792–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60140-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60140-6)
347. Grimaldi G, Kreutzer RD, Hashiguchi Y, Gomez EA, Mimory T, Tesh RB. Description of *Leishmania equatorensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1992. p. 221–8.
348. Loyola EG, Alzate A, Sánchez A, González A. Epidemiology of a natural focus of *Leishmania braziliensis* in the Pacific lowlands of Colombia. III. Natural infections in wild mammals. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82(3):406–7.
349. Adler GH, Becerra MT, Travi BL. Feeding success of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) experimentally exposed to small mammal hosts in an endemic focus of *Leishmania chagasi* in northern Colombia. *Biomedica [Internet]*. 2003;23(4):396–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14968917>
350. Eresh S, de Bruijn M, Mendoza-León J, Barker D. *Leishmania (Viannia) lainsoni* occupies a unique niche within the subgenus Viannia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995;89:231–6.
351. Corrêa JR, Brazil RP, Soares MJ. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the Viannia subgenus - A mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(6):587–92.
352. Silveira F, Souza A, Lainson R, Shaw J, Braga R, Ishikawa E. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará state, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991;86:127–130.
353. Corredor-matus JR, Hernández C, Arias A. Evaluación de parámetros productivos y nutricionales por el uso de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus bifidus* en la dieta del hámster dorado (*Mesocricetus auratus*). 2014;
354. Bonilla-Morales MM, Pulido J, Murillo R. Biología de la lapa: una perspectiva para la zootecia. *Rev CES Med Vet y Zootec*. 2013;8(1):129–42.
355. Gomez-Posada C. Patrón de actividad y de alimentación de un grupo provisionado de *Cebus paella* en un bosque húmedo tropical (Meta-Colombia). *Bol Científico Museo Hist Nat*. 2009;13(1):49–62.

356. Ferro C, Cárdenas E, Corredor D, Morales A, Munstermann LE. Life Cycle and Fecundity Analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93(2):195–9.
357. Dutari LC, Loaiza JR. American Cutaneous Leishmaniasis in Panama: a historical review of entomological studies on anthropophilic *Lutzomyia* sand fly species. Parasit Vectors [Internet]. 2014;7(1):218. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4026118&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
358. Rodriguez-Bonfante C, Bonfante-Garrido R, Grimaldi G, Momen H, Cupolillo E. Genotypically distinct *Leishmania colombiensis* isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. Infect Genet Evol. 2003;3(2):119–24.
359. Dujardin J, Bañuls A, Victoir K, De Doncker S, Arevalo J, Llanos-Cuentas, A Tibayrenc M, et al. From population to genome: ecogenetics of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. Ann Trop Med Parasitol. 1995;89(1):45–53.
360. Davies CR, Campbell-lendrum D, Reithinger R, Campbell-lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, et al. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries Epidemiologia e controle da leishmaniose nos países andinos. Cad Saude Pública, Rio Janeiro. 2000;16(4):925–50.
361. Kato H, Cáceres AG, Mimori T, Ishimaru Y, Sayed ASM, Fujita M, et al. Use of FTA cards for direct sampling of patients' lesions in the ecological study of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol. 2010;48(10):3661–5.
362. Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, Barroso PA, et al. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of ecuador by a polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 2005;72(1):87–93.
363. Hernandez C, Ramirez JD. Molecular Diagnosis of Vector-Borne Parasitic Diseases. Air Water Borne Dis [Internet]. 2013;2(1):1–10. Available from: <http://www.omicsgroup.org/journals/molecular-diagnosis-of-vector-borne-parasitic-diseases-2167-7719.1000110.php?aid=16228>
364. Locatelli FM, Cajal SP, Barroso PA, Lauthier JJ, Mora MC, Juarez M, et al. The isolation and molecular characterization of *Leishmania* spp. from patients with American tegumentary leishmaniasis in northwest Argentina. Acta Trop [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;131(1):16–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.015>