



# Universidade de Brasília

## Repositório Institucional da Universidade de Brasília

*repositorio.unb.br*



**Este artigo** está licenciado sob uma licença Creative Commons Atribuição-NãoComercial 4.0 Internacional.

### **Você tem direito de:**

Compartilhar — copiar e redistribuir o material em qualquer suporte ou formato.

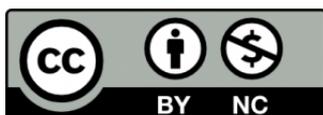
Adaptar — remixar, transformar, e criar a partir do material.

### **De acordo com os termos seguintes:**

Atribuição — Você deve dar o **crédito apropriado**, prover um link para a licença e **indicar se mudanças foram feitas**. Você deve fazê-lo em qualquer circunstância razoável, mas de maneira alguma que sugira ao licenciante a apoiar você ou o seu uso

Não Comercial — Você não pode usar o material para **fins comerciais**.

**Sem restrições adicionais** — Você não pode aplicar termos jurídicos ou **medidas de caráter tecnológico** que restrinjam legalmente outros de fazerem algo que a licença permita.



**This article** is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### **You are free to:**

Share — copy and redistribute the material in any medium or format.

Adapt — remix, transform, and build upon the material.

### **Under the following terms:**

Attribution — You must give **appropriate credit**, provide a link to the license, and **indicate if changes were made**. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use.

NonCommercial — You may not use the material for **commercial purposes**.

**No additional restrictions** — You may not apply legal terms or technological measures that legally restrict others from doing anything the license permits.

Esta licença está disponível em: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

## Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*

### Review of biological and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*

César A. Cuba Cuba

**Resumen** Esta revisión tiene tres objetivos básicos: a) estimular aún más la investigación de esta prevalente infección humana. b) examinar el arsenal de técnicas diagnósticas disponibles al momento y, las nuevas pruebas descritas recientemente. c) enfatizar el significado que tiene, el parasitismo por el *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*, en las áreas endémicas de la Enfermedad de Chagas distribuidas en las Américas Central y del Sur. *Trypanosoma rangeli* y *Trypanosoma cruzi* son parásitos que circulan superponiéndose en muchas áreas de Latinoamérica utilizando prácticamente los mismos triatomíneos vectores. Una vasta gama de especies de mamíferos han sido encontradas infectadas naturalmente con *T. rangeli* en diversos países. Se revisa la biología del parasitismo y el ciclo biológico del tripanosoma haciendo énfasis en este último. Infecciones crónicas por *T. rangeli* en el hombre pueden, serológicamente, ser confundidas con las del *T. cruzi*. Ambas especies presentan antígenos comunes que provocan las conocidas reacciones serológicas cruzadas. Desafortunadamente, no conocemos la real distribución de las infecciones por el *T. rangeli* en la mayoría de las áreas mencionadas. Nuevos estudios epidemiológicos son necesarios, para examinar el problema de las infecciones humanas mixtas, por estos tripanosomas.

**Palabras-claves:** *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. Biología. Epidemiología. Diagnóstico.

*Identificación. diferenciación.*

**Abstract** This review has three objectives: a) To stimulate further research of this prevalent human infection b) to examine the progress of current diagnostic techniques and c) to emphasise the significance of the flagellate parasite *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* in Chagas' Disease endemic areas of South and Central America. Both *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* overlap in many of the areas of Latin America utilising the same triatomine vectors. Also a vast range of mammalian species have been found naturally infected with *T. rangeli*. The biology of the parasitism of *T. rangeli* is revised and emphasis is given regarding its biological cycle. *T. cruzi* and *T. rangeli* share common antigens and cross react serologically. Human infection in the chronic phase may be misdiagnosed as *T. cruzi* infection. Conventional and modern diagnostic and identification methods are discussed. Unfortunately we do not know the real distribution of *T. rangeli* infections in most areas and epidemiological studies to examine concomitant dual infections deserve further investigation.

Unidade de Parasitologia Médica, Departamento de Patologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

Apoyo: CNPq, CAPES, British Council.

Endereço para correspondência: Prof. César A. Cuba Cuba. SQN 107-Bloco "H"-Apto. 506, 70743-080 Brasília, DF, Brasil.

Recibido para publicação em 09/05/97.

**Key-words: Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli.** Biology. Epidemiology. Diagnosis.

*Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*, *Trypanosomatidae*, *Kinetoplastida*, es un protozooario digenético, parásito de diversas especies

de animales domésticos y silvestres, insectos triatominos del Género *Rhodnius* y también del hombre. Este flagelado está ampliamente diseminado en las Américas Central y del Sur, muchas veces superponiendo su distribución geográfica con

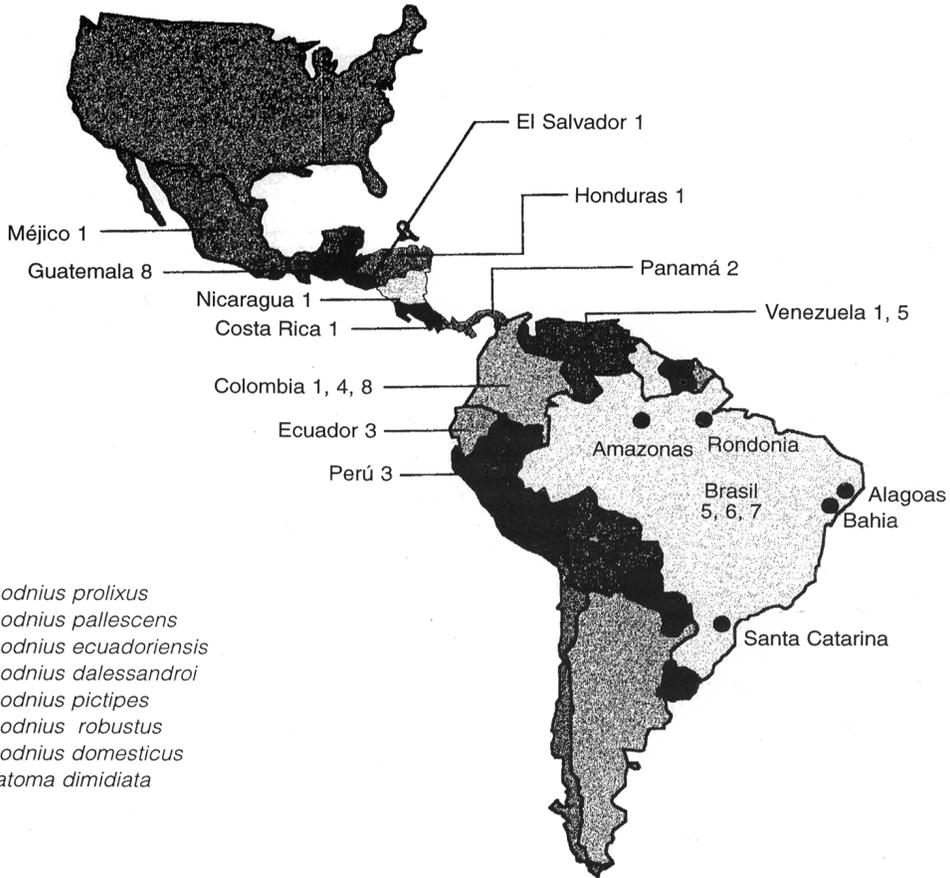


Figura 1 - Distribución geográfica del *Trypanosoma rangeli* y sus vectores comprobados en las Américas Central y del Sur. Reseña de los Estados brasileños con presencia del flagelado\*  
\* no son incluidos los tripanosomas llamados *T. rangeli* - like (tipo *rangeli*).

la otra especie de tripanosomatídeo del Nuevo Mundo, el *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la Enfermedad de Chagas (Figura 1).

El *T. rangeli* fue descubierto en Venezuela por Tejera en 1920 y, desde entonces, muchos estudios fueron efectuados en diversas regiones

de este continente, reconociéndose su gran distribución geográfica. El hecho de estar asociado a los vectores y reservorios del mal de Chagas o tripanosomiasis americana, enriqueció la investigación del *T. rangeli* (Tabla 1 y Tabla 2). *Trypanosoma rangeli* y *Trypanosoma cruzi* son flagelados morfológica, biológica y bioquímicamente

Tabla 1 - *Triatomos vectores comprobados de Trypanosoma rangeli en las Américas Central y del Sur, por países\**.

Especie de Triatomo	País	Referencia bibliográfica
<i>Rhodnius prolixus</i>	Costa Rica	70
	Nicaragua	46
	Honduras	46
	Méjico	appud, 19
	Venezuela	47
	Colombia	18, 26, 28, 50
	El Salvador	69
<i>Rhodnius dalessandroi</i>	Colombia	19
<i>Rhodnius pallescens</i>	Panamá	60
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Perú	14, 31
<i>Rhodnius pictipes</i>	Venezuela	19
	Brasil	41
<i>Rhodnius robustus</i>	Venezuela	19
	Brasil	41
<i>Rhodnius domesticus**</i>	Brasil	7, 56
<i>Triatoma dimidiata</i>	Colombia	37, 45
	Guatemala	19

\*Comprende solamente las especies halladas naturalmente infectadas y capaces de transmitir por la picada el *T. rangeli*.

\*\* Transmitió experimentalmente por picada cepa de *T. rangeli* de Santa Catarina, Brasil<sup>61</sup>.

Tabla 2 - *Especies descritas de mamíferos naturalmente infectados con Trypanosoma rangeli y señalados en países de las Américas del Centro y del Sur\**.

Orden taxonómica	Especies	País
Marsupialia	<i>Didelphis marsupialis</i>	Colombia, Panamá, Brasil
	<i>Philander opossum</i>	Colombia
	<i>Metachirus nudicaudatus</i>	Brasil
Carnivora	<i>Eira barbara</i>	Colombia
	<i>Potos flavus</i>	Colombia
	<i>Nasua nasua</i>	Brasil
	<i>Procyon lotor</i>	Panamá
Edentata	<i>Bradypus griseus</i>	Costa Rica
	<i>Choloepus hoffmani</i>	Panamá, Costa Rica
	<i>Tamandua tetradactyla</i>	Brasil, Colombia
Rodentia	<i>Echimys dasythrix</i>	Brasil
	<i>Cavia porcellus</i>	Perú
	<i>Oryzomys concolor</i>	Colombia
	<i>Proechimys sp</i>	Colombia
Primates	<i>Aotus nancymai</i>	Perú
	<i>Aotus trivirgatus</i>	Colombia
	<i>Cebus albifrons</i>	Colombia
	<i>Cebus capucinus</i>	Colombia, Panamá
	<i>Cebus apella</i>	Colombia
	<i>Saimiri boliviensis</i>	Perú, Bolivia
	<i>Saimiri sciureus</i>	Bolivia, Brasil, Colombia
	<i>Saguinus leucopus, S. oedipus</i>	Colombia
	<i>Saguinus geoffroyi</i>	Perú, Colombia
<i>Saguinus mistax</i>	Brasil	

\* Adaptado de D'Alessandro & Saravia<sup>19</sup>, Miles et al<sup>41</sup>, Sullivan et al<sup>63</sup>.

distintos. El principal problema es que, epidemiológicamente, ellos comparten vectores del género *Rhodnius* y mamíferos reservorios, principalmente marsupiales. Por lo que, el aspecto primordial en el estudio del *T. rangeli*, es la imperiosa necesidad de su correcta identificación y diferenciación con el *T. cruzi*<sup>17</sup>.

Es notable que hasta la fecha, tanto la epidemiología como los aspectos fundamentales de la biología del parasitismo del *T. rangeli* continúan mal comprendidas y abiertas para la investigación interdisciplinaria básica y aplicada.

A fin de orientar al lector, dividimos esta revisión en los siguientes tópicos: biología del parasitismo e interrelaciones parásito-huésped vertebrado e invertebrado; el protozoo parásito; ciclo biológico; el diagnóstico de laboratorio y los comentarios finales.

*Biología del parasitismo: aspectos en debate.*

- **En el huésped vertebrado:** *Trypanosoma rangeli* es considerado una especie de *Trypanosoma* no patógeno para el hombre. Sin embargo, aspectos fundamentales de su reproducción en el huésped vertebrado, que podrían explicar esa aparente falta de virulencia, no están totalmente elucidados. La gran mayoría de las investigaciones efectuadas en los tejidos de vertebrados infectados experimentalmente, han fracasado para demostrar formas intracelulares en diversos órganos. Entretanto, algunos autores relatan la presencia de formas intracelulares, con morfología de amastigotes en ratones de laboratorio experimentalmente infectados, produciendo histopatología moderada<sup>59 66</sup>. Recientemente, en experimentos de infección *in vitro* en células histiocíticas U937, Osorio et al<sup>44</sup> demostraron formas *amastigote-like* que diferían en tamaño significativamente con los amastigotes de *T. cruzi*. Sin embargo, los autores también señalaron que hubo falta de multiplicación intracelular de las mismas, durante el tiempo que duraron sus experimentos.

Esas fallas en el conocimiento de la evolución del *T. rangeli* en el vertebrado serían subsanadas con la ayuda de las actuales herramientas empleadas por la biología molecular. Así, sondas específicas de DNA recombinante asociadas a técnicas de hibridización *in situ*<sup>8</sup>; técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos monoclonales específicos anti-*T. rangeli*<sup>44</sup>; y el uso de la reacción en cadena de polimerasa, PCR<sup>10 43</sup> podrían ser experimentadas, para

comprobar la presencia y capacidad del *T. rangeli* de multiplicarse en los tejidos del huésped vertebrado.

Se discute hasta el presente momento, la posible multiplicación por división binaria, de las formas tripomastigotes en sangre periférica del vertebrado. Ésta fue originalmente descrita por Grewa<sup>126</sup> en ratones experimentalmente infectados. Hemos visto de manera excepcional algunas formas flageladas en aparente división en animales experimentales. Es posible observar células con dos cinetoplastos y dos núcleos sugiriendo ese proceso. Sin embargo, interpretamos esos hallazgos como de formas de tripomastigotes metacíclicos y/o formas en transición morfológica (epimastigotes \* tripomastigotes) recientemente inoculadas por el insecto vector. Por otro lado, parece ser que los triatomíneos se alimentan directamente en los capilares sanguíneos y las formas metacíclicas, presentes en gran número en la luz de las glándulas salivares, podemos encontrarlas agrupadas y en aparente división celular<sup>13</sup>.

Como es de nuestro conocimiento, las formas metacíclicas de *T. cruzi* no se dividen. Sin embargo, *T. cruzi* pertenece al sub-género *Schyzotrypanum* y *T. rangeli* al sub-género *Herpetosoma*. Ambos sub-géneros de la familia *Trypanosomatidae* presentan diferencias substantivas en su parasitismo y evolución en los huéspedes vertebrado e insectos vectores. ¿Estaremos frente a una particular característica de la biología de *T. rangeli*?

Correlacionado con lo anteriormente descrito se sabe que la parasitemia del *T. rangeli* es muy baja, cuando se cuantifica en sangre periférica del vertebrado. D'Alessandro & Saravia<sup>19</sup>, encontraron un bajo número de tripomastigotes sanguíneos, en general 4-5, por 5 mm<sup>3</sup> de sangre periférica de animales infectados experimentalmente, lo que representa un bajo número circulando. Otro de los hallazgos fue la corta duración de la parasitemia patente. Con una cepa peruana del flagelado observamos que esa parasitemia fluctúa entre 1 a 2 años en cobayos de laboratorio (*Cavia porcellus*) dependiendo del método de comprobación parasitológica. Casi nada se sabe en relación al parasitismo humano.

- **En el huésped invertebrado:** La biología del parasitismo de *T. rangeli* en su huésped invertebrado, el insecto vector, casi siempre un triatómino del género *Rhodnius*, ofrece al investigador grandes desafíos a ser enfrentados

y constituye un campo fértil de investigación. Los más importantes hechos biológicos que hacen único y fascinante el *T. rangeli*, son las etapas que realiza en el insecto para completar su ciclo vital. *T. rangeli* invade el hemoceloma del insecto, se multiplica libremente en la hemolinfa y también, intracelularmente, en los diversos tipos de hemocitos y luego, es capaz de invadir las glándulas salivares.

En todos esos compartimientos, microhabitats con metabolismo diferente, el *T. rangeli* es capaz de diferenciarse y sufrir sorprendentes mudanzas morfogénicas. Es pues, la gran plasticidad en su morfogénesis que hace de esta especie un modelo único en biología y fisiología celular.

En contraste con lo que sucede en el huésped vertebrado, el *T. rangeli* es patógeno para su huésped invertebrado. En la mayoría de los casos los tripanosomatídeos heterógenos no afectan sus vectores. El *T. rangeli* es la excepción y ha sido objeto de estudios detallados al respecto, sobretodo en el modelo *Rhodnius prolixus* y otros vectores naturales. Watkins<sup>68</sup>, observó lisis de las células musculares del intestino medio del insecto, cuando las formas del tripanosoma invadían el hemoceloma.

Entretanto, en nuestra experiencia, el *T. rangeli* también es patógeno, experimentalmente, para *Panstrongylus herreri* y *Dipetalogaster maximus*, tanto ninfas como adultos y quizás, para otras especies de triatominos. En esas dos últimas especies de triatominos y dependiendo de las cepas del tripanosoma utilizadas son observadas: interferencia con la ecdisis, deformaciones de los insectos, alteraciones en el comportamiento alimenticio, problemas en la digestión de la sangre ingerida y letalidad.

Nada sabemos al respecto de lo que acontece en los ecótopos naturales de los triatominos. Todavía no está determinado qué sucede entre las poblaciones de triatominos que se encuentran infectados en la naturaleza, en relación a la acción patógena del tripanosoma. Aguardan investigación minuciosa, el análisis de los disturbios fisiológicos y/o anatómicos causados por el parasitismo del tripanosoma; en los intentos de alimentación hematófaga del insecto (*probing*) y en su comportamiento alimentar. Esto último, de gran importancia en la transmisión por inoculación al huésped vertebrado conociendo la dificultad del insecto para ingerir el alimento. Así mismo, en la digestión de la sangre y su interferencia en la

elaboración de la capas membranosas que envuelven el alimento del insecto, cuando se realiza el proceso digestivo.

Es interesante que, Garcia et al<sup>25</sup> estudiando experimentalmente el comportamiento alimenticio del *R. prolixus* infectado por *T. rangeli* concluyeron que, la infección salivar de los insectos, disminuye la habilidad del triatomo para localizar los vasos sanguíneos del animal vertebrado. Estos autores creen que las propiedades antihemostáticas de la saliva del *R. prolixus* son afectadas, por el parasitismo glandular. También podríamos preguntarnos si ese hecho favorecería, la transformación de los flagelados inoculados en formas intracelulares en los puntos de picadura del vertebrado. Es probable que esas formas en los tejidos, sean un paso previo del parásito, en su pasaje al torrente circulatorio.

La hemolinfa es también afectada. Es fácil comprobar su aspecto *lechoso* y con un número reducido de hemocitos de todos los tipos, en insectos densamente parasitados capturados en la naturaleza o, en infecciones experimentales producidas por la inoculación intracelómica. Schaub<sup>52</sup> analizó detenidamente los efectos patógenos del parasitismo en los triatominos por *T. rangeli*. El citado autor llama la atención, por ejemplo, al hecho de que los triatominos infectados presentan una disminución de la concentración de los aminoácidos libres en la hemolinfa. Esto estaría superditado al grado de virulencia de las cepas estudiadas. También fue observado lo contrario, pues un aumento de la concentración de alanina, glicina e isoleucina, se encontró en insectos infectados con cepas de alta virulencia.

En realidad todos los órganos del insecto son lesionados. Además del intestino sufren la acción patógena los tubos de Malpighi, cutícula, tráqueas, glándulas salivares, cuerpos grasos y el sistema nervioso.

Es interesante lo que ocurre en las glándulas salivares del género *Rhodnius*. En *R. ecuadoriensis* y *R. prolixus*, en nuestra experiencia y la de otros autores, las glándulas, en insectos no infectados, son rojo fresa brillante y por eso, fácilmente identificables. Cuando están intensamente parasitadas por el *T. rangeli* ellas mudan su color a un blanquecino *lechoso*. Cuando las observamos, están totalmente recubiertas exteriormente por un *tapete* de flagelados, y en su interior, totalmente llenas de flagelados en diversas

fases de metacicloogénesis. Si examinadas en preparaciones de microscopia electrónica de transmisión, diversas formas intracelulares son descritas en el interior de vacuolas, que son utilizadas por el parásito, para cruzar el plasmalema de la célula glandular y alcanzar la luz de ella<sup>23</sup>.

Nuestras observaciones experimentales de transmisión por la picadura en ratones de laboratorio y *Rhodnius neglectus* infectado en glándulas salivares, han comprobado que, *T. rangeli* puede ser transmitido por el triatomo, por varias veces consecutivas, si interrumpimos la picada (*probing*) y succión ofreciéndole al insecto nuevos animales. De esta manera podríase pensar que, en la naturaleza, el parásito puede ser transmitido muy fácilmente.

*R. neglectus*, en nuestra opinión, es también un vector potencial de *T. rangeli* en el Brasil.

Algunas observaciones aguardan confirmación como por ejemplo, si tripomastigotas metacíclicos y otras formas del flagelado, contenidas en las glándulas salivares y en activa morfogénesis, son competentes para reinfectar su mismo huésped (vector), cuando el insecto, está en activa succión de la sangre del vertebrado. Así mismo, si puede haber diseminación, entre otros triatomos susceptibles, en ocasión de una alimentación simultánea, en el mismo vertebrado, con un insecto infectado<sup>11</sup> o por ejercer el canibalismo<sup>65</sup>. ¿De qué manera ésto influenciaría en los índices de infección de los insectos en la naturaleza?

Aspectos relacionados a la mortalidad provocada por el parásito entre los estadios ninfales del insecto, en la naturaleza y, la influencia del sexo en las infecciones de las glándulas salivares, esperan estudios de campo y de laboratorio. Los mecanismos inmunológicos humorales y celulares, existentes en los insectos, por los cuales los hemócitos matan y eliminan el *T. rangeli* en ciertas especies de triatomos, no están totalmente elucidados. Están en estudio, en insectos infectados, la formación de *nódulos* de hemócitos, que encapsulan los parásitos en la hemolinfa y su relevancia en la susceptibilidad o resistencia al flagelado<sup>35</sup>. También, atención especial se está dando a los fenómenos de aglutinación y lisis del *T. rangeli* y *T. cruzi* estudiados en *R. prolixus*. Las aglutininas actúan sobre los carbohidratos de la superficie celular de los parásitos y se pretende, con este modelo de interacción lectina/parásito, correlacionar el éxito o el fracaso

del tripanosoma, de establecerse en el tubo digestivo o en la hemolinfa del insecto<sup>48</sup>.

Dependiendo del grado de compatibilidad de esa interrelación huésped-parásito, el resultado es un ciclo biológico completo del parásito en el insecto, hasta la formación de los tripomastigotes metacíclicos en las glándulas salivares o, la infección parcial de solamente el intestino o, intestino y hemolinfa, todo eso en índices variables. ¿Cuáles son entonces las barreras fisiológicas y bioquímicas que se presentan, para que exista esa gran variabilidad en el grado y características de infección de los diversos órganos y sistemas del insecto?

Sabemos que, por razones biológicas, fisiológicas y bioquímicas, la susceptibilidad o resistencia entre los géneros y especies de triatomos a la infección por *T. rangeli*, varía grandemente. Es de conocimiento general que las especies del género *Rhodnius* son altamente susceptibles a determinadas cepas de *T. rangeli*. Podríamos especular que el tripanosoma, como resultado de una fuerte presión evolucionaria, desarrolló mecanismos para *escapar* de la respuesta inmune del insecto o, por otro lado, el flagelado es capaz de degradar, inhibir o resistir a los diversos factores antiparasitarios formados en la hemolinfa del insecto infectado.

A pesar que nosotros observamos, elevada densidad de flagelados, en el intestino y hemolinfa de *Dipetalogaster maximus* experimentalmente infectado con *T. rangeli* (cepas peruana, brasileña, panameña y colombiana), en este modelo parásito-insecto, los flagelados no invaden las glándulas salivares. Este es un hecho real sea para las infecciones iniciadas a través de inoculación intracelómica, como también por xenodiagnóstico artificial de alimentación infectante, o con el uso de animales de laboratorio infectados (Cuba Cuba, observaciones no publicadas). Es posible comprobarse también, la eliminación del *T. rangeli* de la hemolinfa del *D. maximus* entre la tercera y quinta semana de la alimentación infectante. Muchos flagelados son observados en proceso de degeneración y fagocitosis, en el interior de los hemócitos. No es posible, también, comprobarse la presencia de formas metacíclicas, como lo registrado en la hemolinfa de insectos vectores del género *Rhodnius*. Hecho semejante ocurre en *Panstrongylus herreri*<sup>12</sup>.

**El parásito. ¿Cómo se diferencia el *T. rangeli* del *T. cruzi*?** Durante muchos años

se han utilizado los términos *T. rangeli*-like, o tripanosomas semejantes al *T. rangeli*, o también tipo-*rangeli*, cuando eran descritos en estudios básicamente morfológicos, flagelados en los diversos huéspedes vertebrados y en triatominos infectados naturalmente. D' Alessandro<sup>18</sup> definió claramente que, para ser denominado un tripanosoma como *T. rangeli*, él debe evolucionar en la hemolinfa del triatominos, invadir sus glándulas salivares y ser transmitido por la picada al vertebrado susceptible. Todos éstos son parámetros biológicos considerados indispensables en la identificación y caracterización del parásito.

Recientemente, y con el objetivo principal de

discriminar el *T. rangeli* del *T. cruzi*, tanto en el insecto vector como en las formas de cultivo *in vitro*, han sido efectuados estudios utilizándose otros parámetros bioquímicos y serológicos (Tabla 3). Las diversas metodologías incluyen, la lisis mediada por el complemento<sup>58</sup>; las investigaciones empleando marcadores isoenzimáticos que demuestran que, las cepas de *T. rangeli* y de *T. cruzi* procedentes de diversas fuentes y orígenes geográficos, pueden ser fácilmente diferenciadas a través de sus padrones isoenzimáticos característicos<sup>22 61</sup>. Esos y otros estudios mostraron además, un polimorfismo menos acentuado, en comparación con *T. cruzi*, en los perfiles electroforéticos de enzimas, por parte

Tabla 3 - Principales parámetros inmunobioquímicos y moleculares utilizados en la caracterización e identificación de *Trypanosoma rangeli* y su diferenciación con el *Trypanosoma cruzi*.

Métodos inmunobioquímicos (refs.)	Métodos moleculares (refs.)
A) Aglutinación por lectinas (actuación): carbohidratos de superficie celular <ul style="list-style-type: none"> <li>∂ manosa/glucosa: <i>Lentil culinaris</i>, <i>Canavallis ensiformis</i> (ConA)<sup>42 58</sup> <i>Pisum sativum</i> (PEA)<sup>58</sup></li> <li>∂ N = acetyl-D-galactosamine: <i>Vicia villosa</i> (VVA)<sup>58</sup></li> </ul>	A) Análisis del DNA genómico (N-DNA): <ul style="list-style-type: none"> <li>∂ hibridización molecular con sondas de DNA nuclear y DNA total<sup>19</sup></li> <li>∂ producto 0,9 kbp DNA, marcador detectado por PCR, específico para <i>T. rangeli</i><sup>10 15 44</sup></li> </ul>
B) Sensibilidad a la lisis mediada por complemento: lisis de formas de cultivo y de heces de triatominos, por sueros humano y de cobayo <sup>38 56</sup>	B) Análisis del k-DNA ( <i>schizodemes</i> ) por enzimas de restricción: <ul style="list-style-type: none"> <li>∂ BspRI, Msp I<sup>24</sup> Eco RI<sup>19</sup> diferencian <i>T. cruzi</i> de <i>T. rangeli</i></li> </ul>
C) Detección de la enzimas neuraminidase por el test fluorescente del 2-(4-methylumbelliferyl)-alpha-D.N. acetylneuraminic acid)-UV luz; y de la sialidase y trans-sialidase en sobrenadantes de cultivos y/o heces de triatominos <sup>40 57</sup>	C) Análisis de isoenzimas: <ul style="list-style-type: none"> <li>∂ 13/14 enzimas diferencian <i>T. rangeli</i> de <i>T. cruzi</i>: ALAT, ASAT, ACON, NAD, MDH, PK, G6PD, ICD, PGK, PGM, GPI, ME<sup>41 62</sup></li> <li>∂ (NSE, discrimina infecciones mixtas en triatominos<sup>22</sup></li> </ul>
D) Tipificación por anticuerpos monoclonales específicos: <ul style="list-style-type: none"> <li>∂ anti-<i>T. rangeli</i> IFAT<sup>5</sup></li> <li>∂ anti-<i>T. cruzi</i> IFAT, ELISA<sup>1 33 44</sup></li> </ul>	D) Análisis pelo método de RAPD/DNA, combinado con análisis de isoenzimas, discrimina ambas especies de tripanosomas e infecciones mixtas <sup>62</sup>
E) Análisis por SDS-PAGE-Inmunoblotting: <ul style="list-style-type: none"> <li>∂ detección del antígeno de 43 kDa, marcador específico<sup>54</sup></li> </ul>	

de las cepas de *T. rangeli*<sup>32</sup>.

Importante campo de estudios ha sido también el uso de lectinas, como marcadores de la composición de los residuos de azúcares en la superficie de *T. rangeli*<sup>42 58</sup>. Observaciones con ConA y PEA (*Pisum sativum*) hechas con formas de cultivo, de la hemolinfa y también, en los tejidos de los insectos infectados, sugieren que, las variaciones de esos azúcares en la superficie del tripanosoma permitirían explicar

por qué algunas cepas de *T. rangeli*, se adaptan mejor a algunas especies de triatominos y son más propicias para evolucionar en los insectos, que otras<sup>51</sup>. Significativo aporte ha surgido ultimamente del arsenal de herramientas de la biología molecular<sup>49 62</sup> Tanaka et al<sup>64</sup> y Henrikson et al<sup>30</sup> en sus estudios de kariotipaje molecular de *T. rangeli*, usando el sistema de *Pulse Field Gel Electrophoresis*, PFGE e hibridización con diversas sondas moleculares, fueron capaces

de identificar bandas cromosómicas específicas de *T. rangeli*, que permitirían clara distinción con las de *T. cruzi*.

La actividad de la enzima sialidase, con expresión exclusiva en *T. rangeli*, fue demostrada por Medina et al<sup>40</sup> y para los autores, constituye este factor, un marcador potencial específico del parásito.

Pensamos, que con excepción de los ensayos de isoenzimas aplicados ya en la identificación de las muestras aisladas de *T. rangeli*, gran parte de las nuevas técnicas moleculares constituyen todavía, arsenal de

laboratorios de investigación en centros especializados. Notamos también, que muchas de esas técnicas no han recibido acogida por parte de los investigadores de la área de Salud Pública.

**El Ciclo Evolutivo del *Trypanosoma rangeli*.**

El Ciclo biológico esquemático que presentamos en la Figura 2, se basa primordialmente en nuestras observaciones en *Rhodnius ecuadoriensis* y *T. rangeli* del Perú y, en un modelo murino utilizando en general cobayas (*Cavia porcellus*). Tiene finalidad didáctica e informa al tropicalista, de manera

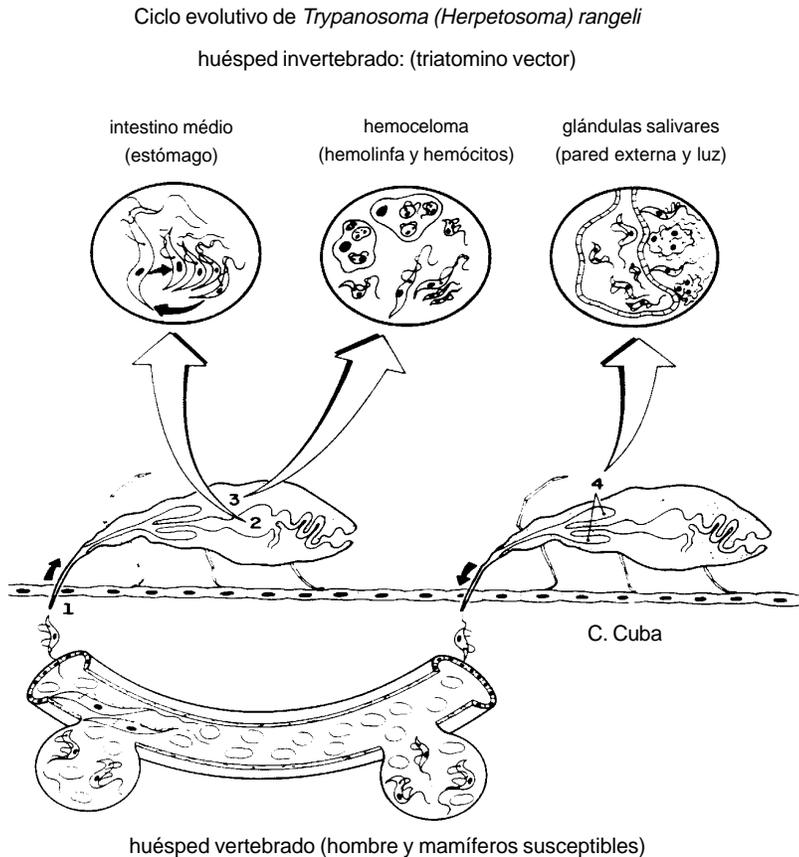


Figura 2 - Diseño esquemático del ciclo biológico de *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* en sus huéspedes vertebrado e insecto triatomino vector. Se representan las formas evolutivas más frecuentemente observadas del flagelado.

simple, cómo el parásito evoluciona en sus huéspedes y cómo se transmite, en la naturaleza. Como todo ciclo evolutivo de un parásito, sirve

también para poder comprender cómo haríamos el diagnóstico morfológico y biológico del parasitismo.

Morfológicamente podemos distinguir en el ciclo vital del *T. rangeli* las siguientes formas evolutivas:

- **En el huésped vertebrado:** trypomastigotes sanguíneos circulantes, que no se multiplican, en la opinión de la gran mayoría de autores. Es polémica la presencia y multiplicación de amastigotes intracelulares en tejidos<sup>19</sup> conforme lo descrito por Scorza et al<sup>59</sup>, en ratones NMRI.
- **En el huésped invertebrado (los triatomino vectores):**
  - *Fase intestinal (intestino anterior o "estómago", medio y posterior):* Añez<sup>3</sup> describe las siguientes formas: amastigotes, epimastigotes (cortas, medianas y largas), esferomastigotes y trypomastigotes. Coincide con nuestras observaciones de no existir trypomastigotes metacíclicos en el intestino.

• *Fase hemolinfática y de parasitismo intracelular de los hemócitos:* Los flagelados que parasitan libremente la hemolinfa son formas trypomastigotes, epimastigotes (con individuos cortos, medianos y muy largos) y trypomastigotes metacíclicos. Grandes masas de flagelados, en activa división binaria longitudinal y también en división múltiple, son observados. En paralelo, formas intracelulares, esferomastigotes y trypomastigotes, contenidas en el citoplasma muy vacuolizado de los hemócitos, son fácilmente observables en los triatomino vectores naturales<sup>4 13 14</sup>.

Se acepta que el *gold standard* en la identificación de un stock de tripanosoma, aislado del hombre o de un mamífero, como *T. rangeli* es que el parásito sea transmitido al vertebrado, por la picada del insecto vector, y si es posible, por la especie local del triatomino.

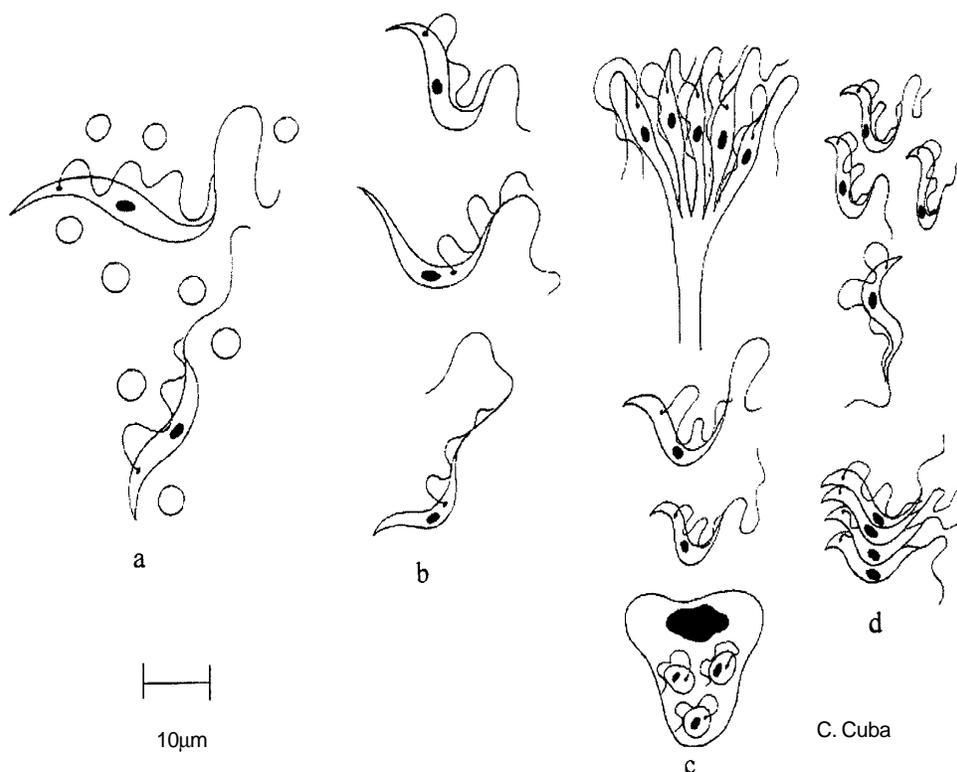


Figura 3 - Formas básicas evolutivas que identifican *Trypanosoma rangeli* morfológicamente cuando observadas en los huéspedes: vertebrado y triatomino vector (casi exclusivamente especies del género *Rhodnius*). a- vertebrado: trypomastigotes sanguíneos, en frotis y gota gruesa (Giemsa). Longitud total: 26-35µm. Cinetoplasto puntiforme y alejado de la extremidad posterior del flagelado. Membrana ondulante bien definida. Baja parasitemia (5-7 trypomastigotes x 5mm<sup>3</sup>). Discutible es la presencia de formas amastigotes intracelulares; b- triatomino vector: intestino y heces. Formas predominantes: muy largos e finos trypomastigotes y epimastigotes (45-56µm); ausencia de formas metacíclicas; c- triatomino vector: hemolinfa y hemócitos: trypomastigotes y epimastigotes finos y muy grandes (más de 50µm); epimastigotes en división longitudinal simples o múltiple. Presencia de trypomastigotes metacíclicos. Formas intracelulares: esferomastigotes en el interior de los hemócitos, formas en división; d- triatomino vector: glándulas salivares: trypomastigotes metacíclicos.

Este es un parámetro netamente biológico y que funciona, pues todo el conjunto de nuevas herramientas moleculares, han confirmado siempre su status de prueba definitiva en la identificación de la especie.

La Figura 3, presenta los principales parámetros morfológicos utilizados para la identificación del *T. rangeli* y su diferenciación con el *T. cruzi*. Obviamente que la morfología, es parte de la secuencia obligatoria de características biológicas, ya señaladas anteriormente, que deben documentarse para confirmar definitivamente la especie y su diferenciación con otros tripanosomatídeos frecuentes en ambos huéspedes.

**El Diagnóstico laboratorial de la tripanosomiasis por *T. rangeli*.** Los estudios que investigan la antigenicidad e inmunogenicidad del *T. rangeli* en su huésped vertebrado enfrentan dos problemas básicos: comprobación de su reacción cruzada con *T. cruzi*<sup>27 36</sup> y la dificultad en el diagnóstico serológico específico definitivo<sup>53</sup>. Afchain et al<sup>2</sup>, comparando las similitudes antigénicas de *T. cruzi* y *T. rangeli* por inmunoelectroforesis, observan que, 60% de los antígenos identificados fueron comunes para las dos especies. Inmunofluorescencia indirecta (IFAT), la prueba inmunoenzimática de ELISA y el Western Blot demuestran alta sensibilidad, pero, especificidad discutible con antígenos preparados de formas epimastigotes y/o tripomastigotes del *T. rangeli*.

Algunos autores creen ser posible una distinción serológica entre pacientes humanos infectados con *T. rangeli* de aquellos que lo son por *T. cruzi*<sup>29</sup>. Estos autores consideran que, la seropositividad obtenida con los antígenos de *T. rangeli* en la ausencia de reactividad con los antígenos de *T. cruzi*, es una indicación de infección por el *T. rangeli*. Consideran también que, el más importante hecho en el diagnóstico serológico de tripanosomiasis causada por *T. rangeli* y/o *T. cruzi*, es la reacción cruzada unilateral en que los sueros de los individuos con infecciones por *T. cruzi* presentan extensa reacción con los antígenos de *T. rangeli*; mientras que, los sueros de las infecciones causadas por el *T. rangeli* no reaccionan con los antígenos de *T. cruzi*, o lo hacen de forma muy débil, siendo de difícil detección. La estrategia de los autores de combinar IFAT y ELISA (ésta última con el antígeno GP90 de *T. cruzi*) no se ha difundido entre los investigadores.

En conclusión, con las técnicas

inmunodiagnósticas clásicas disponibles, el serodiagnóstico de la infección por el *T. rangeli* se mantiene como un problema sin aparente solución, por la falta de un antígeno purificado especie-específico. Este hallazgo constituye una prioridad si deseamos comprender la epidemiología de las tripanosomiasis en América. En infecciones por *T. rangeli* en el hombre, la respuesta inmune humoral es aparentemente débil cuando comparada con la obtenida con *T. cruzi*. Anthony et al<sup>6</sup> observan que, de 58 pacientes positivos por xenodiagnóstico a *T. rangeli*, 22 no mostraron evidencia serológica de anticuerpos circulantes.

Por otro lado, no existe protección cruzada, pues son frecuentes las infecciones mixtas, por ambas especies de tripanosomas, en el hombre (y desconocemos sus implicaciones clínico-patológicas evolutivas) y otros vertebrados domésticos y silvestres, en áreas endémicas de América Central y del Sur.

**Búsqueda de antígenos específicos de *T. rangeli*.** La identificación y caracterización de antígenos específicos de *T. rangeli* ha sido por mucho tiempo descuidada, si la comparamos con el gran avance sucedido en relación al *T. cruzi*.

Antígenos recombinantes y secuencias de péptidos sintéticos son ya de uso en diversos laboratorios de inmunodiagnóstico de enfermedades parasitarias. Ejemplos tenemos actualmente en Leishmaniasis visceral y cutánea<sup>9 34</sup> y en la Enfermedad de Chagas<sup>39</sup>. Esos reactivos moleculares serían de gran ayuda en el desarrollo de pruebas serológicas de diagnóstico específico que permitirían diferenciar, sin margen de error significativo, entre las infecciones provocadas por las dos especies simpátricas de tripanosomas, en las áreas de transmisión.

Recientemente, Saldaña et al<sup>54</sup> describieron, a través del análisis por *immunoblotting* de epimastigotes del flagelado, un antígeno de *T. rangeli* de aproximadamente 43 kDa, que reacciona específicamente con sueros homólogos murinos hiperinmunes. Los autores afirman ser esta proteína un marcador específico del parásito. Es posible, que los estudios que utilicen sueros hiperinmunes de animales experimentales, pueden estimar, en exceso, el grado de reacción específica. La utilización de la glicoproteína de *T. cruzi* de 90 kDa (GP90)<sup>55</sup> no ha sido suficientemente explorada. Esto último sobre todo

sí, como se afirma, ella es ausente en las infecciones por *Leishmania* y *T. rangeli*. En el caso de la proteína de 43 kDa, nuevas observaciones son necesarias, en un número significativo de cepas del parásito de origen y distribución geográfica amplia, a fin de confirmar, la frecuencia de este marcador molecular, y su especificidad y sensibilidad frente a sueros de humanos infectados por el *T. rangeli*.

Pensamos que el problema básico en el avance de la serología específica de tripanosomiasis por *T. rangeli* radica en, la falta de un banco de sueros humanos procedentes de infecciones puras del parásito y con historias clínicas bien documentadas.

En la actualidad, muchos estudios serológicos de campo de la enfermedad de Chagas, que se realizan en áreas de superposición con la infección por *T. rangeli*, deberían tomar en consideración que se desconoce la real incidencia de las infecciones mixtas por ambas especies de tripanosomas y su consecuencia, en la respuesta inmunológica humoral y, en el comportamiento clínico de los pacientes doblemente infectados.

Un ejemplo reciente, es el que se presenta en Brasil en la región norte del Estado de Amazonas, con la descripción de los primeros casos humanos de infección por *T. rangeli*<sup>15</sup> en locales en que también se relatan alta prevalencia serológica de infección chagásica y, por lo menos un caso con aislamiento del *T. cruzi* por xenodiagnóstico<sup>16</sup>. ¿Estaría *T. rangeli* causando esos altos índices de seropositividad?

Finalmente en laboratorios con infraestructura básica y elemental, como son los de la gran mayoría de la red de Salud Pública, el diagnóstico apropiado de las infecciones causadas por *Trypanosoma rangeli* dependerá de los objetivos que se persigan. Así, si es el diagnóstico de infecciones humanas o, si se trata de estudios epidemiológicos de incidencia y/o prevalencia del *T. rangeli*, las acciones serían diferentes.

En el caso de infecciones humanas, la demostración directa del parásito en sangre periférica al fresco, entre lámina y laminilla microscópicas, es bastante precaria debido a la bajísima parasitemia circulante del flagelado. Esto también es constatado cuando se preparan frotis y gota gruesa de sangre. El siguiente recurso sería el hemocultivo de sangre periférica. No existen datos en la literatura sobre

la sensibilidad diagnóstica de este método. Sin embargo, visto que *T. rangeli* es fácil de cultivar en medios difásicos de agar sangre y también, en medios líquidos como Schneider's, LIT (Liver infusion tryptose), RPMI etc., su uso, es una buena alternativa, aunque un poco onerosa.

Una tercera opción sería el uso del xenodiagnóstico. El procedimiento es similar al utilizado en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Nosotros pensamos que la utilización de ninfas de *Dipetalogaster maximus* (I, III o V estadio), servirían por dos razones: a) esta especie de triatomino es susceptible a la infección experimental por diversas cepas del *T. rangeli*, tanto en el intestino como en la hemolinfa. En *D. maximus*, una proporción significativa de insectos, presentan hemolinfa positiva (22%). Ésta es una de las características biológicas clásicamente utilizada para reconocer un tripanosoma como *T. rangeli* (Cuba Cuba, observaciones no publicadas) y b) No causar reacciones alérgicas dermatológicas como las producidas por ciertas especies de *Rhodnius*. Existe también la posibilidad del xenodiagnóstico artificial para evitar esos cuadros de dermatitis por la picadura de los insectos. Entre tanto, sería pertinente un estudio comparativo de la sensibilidad de *D. maximus* y de la especie de *Rhodnius* local prevalente.

En el examen de material biológico de triatominos capturados en la naturaleza, la demostración del tripanosoma debería seguir la siguiente secuencia estratégica: a) primeramente, examen de la hemolinfa, por simple corte de un segmento del fémur de una de las patas del insecto. El fluído de una o dos gotas de hemolinfa es suficiente para hacer una apropiada observación de la muestra, con la presencia de los hemócitos parasitados en los insectos infectados, generalmente en gran número. La observación será al fresco y también después de coloración con Giemsa; b) en segundo lugar, el examen del contenido de la ampolla rectal por presión, con pinzas, del abdomen y obtención de heces. Luego proceder de manera rutinaria como se hace en el xenodiagnóstico para *T. cruzi*, es decir disección del intestino medio del insecto y observación de las formas muy largas de epimastigotes del *T. rangeli*. Esta orden en el procedimiento es necesario para, así, evitar la contaminación de la hemolinfa por formas intestinales del parásito, en el momento de la manipulación del insecto.

Pensamos que es útil la coloración de frotis

de heces de los insectos positivos. Nuevamente la coloración de Giemsa es utilizada. Llamamos la atención para la dificultad de colorear las heces de los triatomínicos infectados. Nosotros acostumbramos a lavar, por centrifugación con PBS (phosphate buffer solution), la suspensión de heces y después colorear el sedimento. El aspecto morfológico distintivo será las características del tamaño y localización del cinetoplasto, visibles tanto en las formas enormes de epimastigotes como de trypomastigotes. Esto sólo será posible distinguir nítidamente si se logran buenas coloraciones. Debe alertarse al investigador que existe relativa dificultad de excluirse la presencia de *T. cruzi* cuando, se observan formas poco típicas de flagelados, trypomastigotes y epimastigotes, de tamaño mediano. En este caso inoculaciones de ratones de laboratorio ayudan, en parte, para demostrar la presencia del *T. cruzi*.

Las mismas técnicas de diagnóstico utilizadas para los pacientes humanos son empleadas para la demostración del flagelado en los huéspedes reservorios.

Solamente cuando haya necesidad de estudios epidemiológicos que comprendan taxonomía y tipificación de stocks de *T. rangeli* procederíamos a la inoculación experimental y/o transmisión por la picada de los insectos positivos. El objetivo sería entonces el aislamiento primario de las cepas del flagelado y posterior estudio. La sugerencia de D'Alessandro & Saravia<sup>19</sup> de inocular los flagelados aislados, directamente en la cavidad hemocelómica de un triatómico vector, podría también ser tomada en consideración. Sabemos que sólo *T. rangeli* sobrevive en la hemolinfa del insecto.

*Comentarios finales.* Para intentar conocer la real distribución geográfica y prevalencia de la infección humana por *T. rangeli*, podría pensarse, en una estrategia que combine la demostración parasitológica y la serología. Sin embargo, ambos procedimientos son realmente de valor limitado. La demostración directa del flagelado en muestras de sangre periférica tienen valor práctico insignificante en términos de trabajo-beneficio. Si utilizamos los triatomínicos adecuados (preferencialmente los vectores locales), podríamos obtener xenodiagnósticos con positividad decreciente: en heces, hemolinfa

y, en menor proporción, en glándulas salivares. El problema radica en el entrenamiento del personal técnico, en el examen de la hemolinfa y de las glándulas salivares.

La serología es todavía más limitada por la ausencia de antígenos especie-específicos. En las condiciones actuales tendría que usarse antígenos brutos derivados de cepas de *T. rangeli*, que parecen ser más específicos, y un sistema de ELISA en la forma de DOT-Blot. Esta sugerencia serviría también, quizás con las adaptaciones técnicas apropiadas, para estudios de material provenientes de hemocultivos humanos o de cultivos del parásito obtenidos de animales reservorios.

Es opinión del autor, que en el contexto actual de capacitación de los recursos humanos y de la infraestructura de los servicios de Salud Pública de América Latina, los parámetros de identificación morfológicos y biológicos, en manos experimentadas, son todavía de gran utilidad práctica como elementos de identificación de *Trypanosoma rangeli*.

Finalmente, a los estudiosos de la biología del parasitismo por tripanosomatídeos heteroxenos alertamos: *T. rangeli* constituye un modelo experimental de gran potencial de exploración científica, en el complejo campo del fenómeno de la morfogénesis de un parásito protozoario digenético y en estudios de inmunidad celular en insectos.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acosta L, Romanha AJ, Cosenza H, Krettli AU. *Trypanosomatids* isolates from Honduras: differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 44: 676-683, 1991.
2. Afchain D, Le Ray D, Fruit J, Capron A. Antigenic make up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. Journal of Parasitology 65: 507-514, 1979.
3. Añez N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. V-Developmental pattern in the alimentary canal of *Rhodnius prolixus*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 78:183-191, 1983.
4. Añez N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VI-Developmental pattern in the haemolymph of *Rhodnius prolixus*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 78: 413-419, 1983.
5. Anthony RL, Cody TS, Constantine NT. Antigenic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* by means of monoclonal hybridoma antibodies. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 30:1192-1197, 1981.
6. Anthony RL, Johnson CM, Sousa OE. Use of micro-ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. The American Journal of Tropical

- Medicine and Hygiene 28:969-973, 1979.
7. Barrett TV, Oliveira TS. A trypanosome indistinguishable from *Trypanosoma rangeli* in the haemolymph of *Rhodnius domesticus* from Brazil. The Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 71: 445-446, 1977.
  8. Barker DC, Butcher J, Gibson LJ, Kennedy P, Williams RH, Cuba Cuba C, Marsden PD, Lainson R, Shaw JJ. Sequence homology of kinetoplast DNA in *Leishmania* studied by endonucleases digested fragments and *in situ* hybridization of individual organisms. In: *Leishmania* Taxonomie and Phylogenese. Applications eco-epidemiologiques. IMEE. Montpellier 41-445, 1986.
  9. Blaxter ML, Miles MA, Kelly JM. Specific serodiagnosis of visceral Leishmaniasis using a *Leishmania donovani* antigen identified by expression cloning. Molecular and Biochemical Parasitology 30: 259-270, 1988.
  10. Campbell DC, Gonzalez I, Jaramillo C, Montilla M, Rojas W, Labrada LA, Lopez W, Osorio Y, Santrich, C. Resumen del Taller sobre el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para distinguir entre *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* Biomédica 13: 94-101, 1993.
  11. Cuba Cuba CA. Development of *T. rangeli* metacyclic forms from triatomid bugs' salivary glands ingested by *Rhodnius ecuadoriensis*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 66: 944-945, 1972.
  12. Cuba Cuba CA. Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli*. III Observações sobre a infecção experimental de *Panstrongylus herreri*, Wygodzinsky 1948. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 117:211-217, 1975.
  13. Cuba Cuba CA. Estudo de uma cepa peruana de *Trypanosoma rangeli*. IV Observações sobre a evolução e morfogênese do *T. rangeli* na hemocele e glândulas salivares de *Rhodnius ecuadoriensis*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 17: 284-297, 1975.
  14. Cuba Cuba CA, Morales N, Fernández E, Fernández W. Hallazgo de *Rhodnius ecuadoriensis* Lent & León, 1958 infectado naturalmente por *Trypanosomas* semejantes a *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 en caseríos de la Provincia de Cascas, Contumazá, Perú. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 14:191-202. 1972.
  15. Coura J R, Fernandez O, Arboleda M, Barett T V, Carrara N, Degrave W, Campbell D A. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. Transactions of the Royal Society and Tropical Medicine and Hygiene 90:278-279, 1996.
  16. Coura J R, Willcox H P, Arboleda Naranjo M, Fernandez O, Paiva D D. Chagas' disease in the Brazilian Amazon III. A cross-sectional study. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 37: 415-420, 1995.
  17. D'Alessandro A. New experimental vectors of Colombian *Trypanosoma rangeli*. Journal of Medical Entomology 9:187-195, 1972.
  18. D'Alessandro A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: Lumsden WHR, Evans DA (eds) Biology of *Kinetoplastida*. Academic Press, London Vol. 1, p. 327-403, 1976.
  19. D'Alessandro A, Saravia NG. *Trypanosoma rangeli*. In: Kreier J, Baker JR (eds) Parasitic protozoa, 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press, New York, Vol 2, p 1-45, 1992.
  20. Deane LM. Encontro de tripanossomo do tipo *rangeli* em gambás da espécie *Didelphis marsupialis marsupialis* no Estado de Pará. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais 10:451-458, 1958.
  21. Deane LM. Novo hospedeiro de tripanossomas dos tipos *cruzi* e *rangeli* no Estado de Pará. O marsupial *Metachirops opossum opossum*. Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais 10: 531-541, 1958.
  22. Ebert F. Isoenzymes of *Trypanosoma rangeli* stocks and their relation to other trypanosomes transmitted by triatomid bugs. Tropical Medicine and Parasitology 37:2251-254, 1986.
  23. Ellis DS, Evans DA, Stamford S. The penetration of the salivary glands of *Rhodnius prolixus* by *Trypanosoma rangeli*. Zeitschrift für Parasitenkunde 62:63-74, 1980.
  24. Frasch ACC, Gojman SG, Cazzulo JJ, Stoppani AOM. Constant and variable regions in DNA mini-circles from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Application to species and stocks differentiation. Molecular Biochemistry Parasitology 4:163-170, 1981.
  25. Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Ribero JM. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. Experimental Parasitology 78:287-393, 1994.
  26. Grewal MS. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in its vertebrate and invertebrate hosts. Transactions of the Royal Society and Tropical Medicine and Hygiene 50: 301-302, 1956.
  27. Grogl M, Kuhn RE. Identification of antigens of culture forms of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* recognized by sera from patients with chronic Chagas' disease. Journal of Parasitology 70: 822-824, 1984.
  28. Groot H. Further observations on *Trypanosoma ariarii* of Colombia South America. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1: 585-592, 1952.
  29. Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, Jaramillo CA, Bridge D. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. Parasitology 94: 475-484, 1987.
  30. Henrikson J, Solari A, Ryd-aker M, Sousa OI, Peterson U. Karyotype variability in *Trypanosoma rangeli* Parasitology 112:385-391, 1996.
  31. Herrer A. Reproducción de un *Trypanosoma* tipo *rangeli* a nivel de la glándula salivar del *Rhodnius ecuadoriensis*. Archivos Peruanos de Patología Clínica 18: 251-254, 1964.
  32. Holguin AF, Saravia NG, D'Alessandro A. Lack of enzyme polymorphism in *Trypanosoma rangeli* stocks from sylvatic and domiciliary transmission cycles in Colombia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 36: 53-58, 1987.
  33. Hudson L, Guhl F, Marinkelle CJ, Rodríguez J. Use of Monoclonal Antibodies for the differential detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in epidemiological studies and xenodiagnosis. Acta Tropica 44: 387-394, 1987.
  34. Jensen ATR, Gaafar A, Ismail A, Christensen CV, Kemp M, El Hassam AM, Kharazami A, Theander TG. Serodiagnosis of cutaneous Leishmaniasis: assessment of an Enzyme-linked immunosorbent assay using a peptide sequence from a gene B protein. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 55: 490-495, 1996.
  35. Lackie AM. Immune mechanisms in insects. Parasitology Today 4:98-105, 1988.
  36. Maekelt GA, Diaz Vasquez A. La especificidad del antígeno de Schizotrypanum cruzi fijador de complemento, frente a infección por *Trypanosoma rangeli*. Archivos Venezolanos de

- Medicina Tropical y Parasitología Médica 4: 183-193, 1962.
37. Marinkelle CJ. *Triatoma dimidiata capitata* a natural vector of *Trypanosoma rangeli* in Colombia. *Revista de Biología Tropical* 15:203-205, 1967.
  38. Marinkelle CJ, Vallejo GA, Guhl F, de Sánchez N. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the intestine of the vector *Rhodnius prolixus*, based on the behaviour of these flagellates with regard to the lytic activity of complement. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 27:21-25, 1985.
  39. Martinez JO, Campetella O, Frasch AC, Cazzulo JJ. The reactivity of sera from chagasic patients against different fragments of cruzipain, suggest the presence of defined antigens and catalytic domains. *Immunology Letters* 35:191-196, 1993.
  40. Medina-Acosta E, Franco AM, Jansen AM, Sampol M, Neves N, Pontes de Carvalho L, Grimaldi Jr G, Nussenzweig V. Transialidase and sialidase activities discriminate between morphologically indistinguishable *Trypanosomatids*. *European Journal of Biochemistry* 225:333-339, 1994.
  41. Miles MA, Arias JR, Valente SAS, Naiff RD, De Souza AA, Povoá MM, Lima JA, Cedillos RA. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32:1251-1259, 1983.
  42. Miranda Santos IKF, Pereira ME. Lectin discriminate between pathogenic and non-pathogenic South American trypanosomes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33:839-844, 1984.
  43. Murthy VK, Dibbern KM, Campbell DA. PCR amplification of mini exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Molecular and Cellular Probes* 6: 237-243, 1992.
  44. Osorio Y, Travi BL, Palma GI, Saravia NG. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. *Journal of Parasitology* 81: 687-693, 1995.
  45. Peñalver LM, Rodríguez MI, Bloch M, Sancho G. Trypanosomiasis en El Salvador. *Archivos del Colegio de Medicina. El Salvador* 18:97-134, 1965.
  46. Ponce C, Zeledón R. La Enfermedad de Chagas en Honduras. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 72:239-248, 1973.
  47. Pifano F, Mayer M. Hallazgo de formas evolutivas del *Trypanosoma rangeli* en el jugo de la trompa de *Rhodnius prolixus* de Venezuela. *Archivos Venezolanos de Patología Tropical y Parasitología Médica* 2:153-158, 1949.
  48. Ratcliffe NA, Nigam Y, Mello CB, Garcia ES, Azambuja P. *Trypanosoma cruzi* and erythrocyte agglutinins: a comparative study of occurrence and properties in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology* 83:83-93, 1996.
  49. Recinos RF, Kirchoff LV, Donelson JE. Characterization of kinetoplast DNA minicircles in *Trypanosoma rangeli*. *Molecular Biochemical Parasitology* 63: 59-67, 1994.
  50. Rey Matiz H. Observaciones sobre *Trypanosomas* en Colombia. *Revista de la Facultad Medicina de Bogotá* 10:25-49, 1941.
  51. Rudin W, Schwarzenbach M, Hecker H. Binding of lectins to culture and vector forms of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Protozoa, *Kinetoplastida*) and to structures of the vector gut. *Journal of Protozoology* 36:532-538, 1989.
  52. Schaub GA. The effects of *Trypanosomatids* on insects. In: Dawes B (ed) *Advances in Parasitology*. Academic Press, London Vol 31, p 255-319, 1992.
  53. Saldaña A, Orn A, Henryksson J, Sousa OE. Evaluación de cuatro métodos inmunobioquímicos/ moleculares en la identificación de cepas de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*. *Revista de Medicina de Panamá* 18: 41-52, 1993.
  54. Saldaña A, Sousa OE, Orn A. Immunoparasitological studies of *Trypanosoma cruzi* low virulence clones from Panamá: humoral immune responses and antigenic cross-reactions with *Trypanosoma rangeli* in experimentally infected mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 42: 644-650, 1995.
  55. Schechter MJ, Flint E, Voller A, Guhl F, Marinkelle CJ, Miles MA. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Lancet* 2 (8356): 939-941, 1983.
  56. Schottelius J. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* by their different complement sensitivity. *Tropenmedizin Parasitenkunde* 33: 147-150, 1982.
  57. Schottelius J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Tropical Medicine Parasitology* 38: 323-327, 1987.
  58. Schottelius J, Muller V. Interspecific differentiation of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma conorhini* and *Trypanosoma rangeli* by lectins and combination with complement lysis. *Acta Tropica* 41:29-38, 1984.
  59. Scorza CA, Urdaneta Morales S, Tejero F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: Preliminary report on histopathology in experimentally infected mice. *Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo* 28:371-378, 1986.
  60. Sousa DE, Johnson CM. Frequency and distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Republic of Panamá. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 20:405-410, 1971.
  61. Steindel M, Carvalho Pinto C, Toma HK, Mangia RH, Ribeiro-Rodríguez R, Romanha A. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echymys dasythrix*) in Santa Catarina island, Santa Catarina State: first report of this Trypanosome in Southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 86:73-79, 1991.
  62. Steindel M, Dias-Neto E, Pinto CJ, Grisaard EC, Menezes CL, Murta SM, Simpson AJ, Romanha AJ. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *Journal Eukaryotic Microbiology* 41:261-267, 1994.
  63. Sullivan JJ, Staurer F, Benavides RL, Tarleton RL, Eberhard ML, Landry S. Trypanosomes and microfilariae in feral owls and squirrel monkeys maintained in research colonies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49: 254-259, 1993.
  64. Tanaka T, Yaneda Y, Iida A, Tanaka M. Homologous cysteine proteinase genes located on two different chromosomes from *Trypanosoma rangeli*. *International Journal of Parasitology* 24:179-188, 1994.
  65. Tobie EJ. Fate of some culture flagellates in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Parasitology* 54:1040-1046, 1968.
  66. Urdaneta Morales S, Tejero F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920, intracellular amastigote stages of reproduction in white mice. *Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo* 28:166-169, 1986.
  67. Vallejo GA, Macedo AM, Chiari E, Pena SO. Kinetoplast DNA