

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en caninos de Costa Rica y evaluación de nuevos casos de tripanosomiasis canina en la comunidad de Getsemaní en Heredia

Marta Cristina Bonilla González

Universidad Nacional, Heredia, febrero 2018

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar por el grado de *Magister Scientiae*

Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en caninos de Costa Rica y evaluación de nuevos casos de tripanosomiasis canina en la comunidad de Getsemaní en Heredia

Marta Cristina Bonilla González

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar por el grado de *Magister Scientiae*

Miembros del Tribunal Examinador

Caterina Guzmán Verri, Ph.D.

Representante del Consejo Central del Posgrado

Sandra Estrada, M.Sc.

Coordinadora PCVET

Gaby Dolz, Ph.D.

Tutora

Marco Vinicio Herrero Acosta, Ph.D.

Lector

Andrea Urbina Villalobos, M.Sc.

Lectora

Marta C. Bonilla González

Sustentante

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad, la guía y sabiduría para realizar este proyecto.

A mis padres, por darme siempre todo su apoyo, por enseñarme a luchar y esforzarme para realizar todo siempre con éxito, con una sonrisa y mucha dedicación.

A mi hermana, quien me acompaña siempre en todos mis proyectos, brindándome apoyo y aliento para continuar.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gaby Dolz por darme esta maravillosa oportunidad y brindarme siempre su apoyo y guía, por darme siempre sabios consejos para continuar realizando los trabajos lo mejor posible y con mucha dedicación.

A mis lectores, Dr. Marco Herrero y Dra. Andrea Urbina, por brindarme sus conocimientos sobre el tema.

A la M.Sc. Ruth Castro, por darme una gran asesoría en el diagnóstico molecular.

A todos los propietarios y caninos que participaron en el proyecto.

A los estudiantes de la Escuela de Medicina Veterinaria, quienes participaron en las giras para tomar muestras.

A todo el personal del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales (PCVET), por estar siempre pendiente de las necesidades.

A Mauricio Andino, Daisy Fallas y Luana Andrade, por su linda amistad, por acompañarme en esta maestría y compartir tantos lindos momentos juntos.

Y a todas las personas, amigos y compañeros de la Escuela de Medicina Veterinaria, quienes siempre han estado brindándome su afecto en el transcurso de estos años.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Índice general.....	vi
Índice de cuadros.....	viii
Índice de figuras.....	ix
Resumen general.....	x
Introducción general.....	xii
Referencias bibliográficas.....	xxiv

ARTÍCULO I

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
2. Metodología.....	5
2.1 Tipo de estudio.....	5
2.2 Procedencia, tipo y tamaño de la muestra	6
2.3 Recolecta de datos	7
2.4 Análisis serológico	8
3. Resultados.....	9
4. Discusión	14
5. Conclusiones	19
6. Recomendaciones	19
7. Referencias bibliográficas	20

	Página
ARTÍCULO II	
Resumen.....	25
Abstract.....	26
1. Introducción.....	27
2. Metodología.....	30
2.1 Tipo de estudio.....	30
2.2 Descripción del área de estudio	30
2.3 Tipo y tamaño de la muestra.....	32
2.4 Recolecta de datos.....	32
2.5 Toma de la muestra de sangre	33
2.6 Observación microscópica	33
2.7 Análisis serológico	34
2.8 Análisis molecular	35
2.9 Electrocardiograma y ecocardiograma	37
3. Resultados.....	38
4. Discusión	43
5. Conclusiones.....	47
6. Recomendaciones	47
7. Referencias bibliográficas	48
Discusión general	54
Conclusiones generales	63
Recomendaciones generales	64
Anexos	65

ÍNDICE DE CUADROS

Página

ARTÍCULO I

Cuadro 1. Estudios serológicos de <i>T. cruzi</i> realizados previamente en caninos de Costa Rica...	5
Cuadro 2. Títulos de anticuerpos y procedencia de los caninos seropositivos a <i>T. cruzi</i>	10
Cuadro 3. Características de los cinco caninos seropositivos para <i>T. cruzi</i>	11
Cuadro 4. Cantones con estudios serológicos de <i>T. cruzi</i> en caninos de Costa Rica	12

ARTÍCULO II

Cuadro 1. Protocolo “gradiente hacia abajo” para la PCR anidada del gen 18S rRNA de <i>T. cruzi</i>	37
Cuadro 2. Resultados de los seis caninos seropositivos en las dos pruebas serológicas en la comunidad de Getsemaní en los años 2015 y 2016.....	38
Cuadro 3. Características de los seis caninos seropositivos para <i>T. cruzi</i>	39
Cuadro 4. Resultados de PCR y serología del canino # 2 en la comunidad de Getsemaní, en los años 2015 y 2016.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

ARTÍCULO I

- Figura 1.** Reacciones positivas (columnas 1, 3 y 5) y negativas (restantes columnas) de sueros caninos en la HAI de *T. cruzi* (1: Control +, 12: Control -)..... 9
- Figura 2.** Reacción positiva (A) y negativa (B) de sueros caninos en la IFI de *T. cruzi*..... 9
- Figura 3.** Distribución geográfica de los cantones con estudios serológicos de *T. cruzi* en caninos de Costa Rica 13

ARTÍCULO II

- Figura 1.** Distribución de las viviendas en estudio de la comunidad de Getsemaní, según la presencia de vectores y resultados de los caninos positivos..... 31
- Figura 2.** Análisis electroforético de la muestra canina positiva en la PCR de *T. cruzi*, en gel de agarosa al 1%, TBE 1X y tinción con GelRed. **MM:** Marcador de peso molecular (GenRuler 100 pb DNA Ladder Plus, Fermentas®), **1:** Control positivo, **2:** Muestra canina (perro 2), **3:** Control negativo..... 40
- Figura 3.** Árbol filogenético basado en las secuencias de 638 pb del gen 18S rRNA de las muestras de caninos y chinches de la comunidad de Getsemaní infectados con *T. cruzi*.. 41

RESUMEN GENERAL

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad zoonótica producida por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, el cual puede infectar a humanos, animales domésticos y silvestres. En Costa Rica, sólo se han realizado estudios sobre tripanosomiasis canina en 12 de un total de 82 cantones, encontrándose en todos los cantones estudiados caninos infectados con *T. cruzi*. Además, no se han realizado estudios que investiguen la infección de *T. cruzi* en perros de áreas endémicas a través del tiempo mediante diagnóstico serológico y molecular, e identificando el linaje de evolución de *T. cruzi* infectando a los perros y a los triatomos.

El primer objetivo de la investigación fue determinar la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en 427 caninos provenientes de 28 cantones de Costa Rica, para determinar la seroprevalencia a nivel nacional, y determinar si los caninos seropositivos se presentan únicamente en cantones donde se ha reportado previamente el vector y el parásito en perros, o si se presentan casos en otros cantones del país aún no investigados. Las muestras de suero canino se analizaron mediante las pruebas de hemaglutinación indirecta (HAI) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Un total de cinco caninos (1.17%) resultaron positivos, provenientes de cuatro cantones distintos (Mora, San Rafael de Heredia, Liberia y Golfito), la seroprevalencia determinada a nivel nacional fue 1.17%. Se determinó, por primera vez, la presencia de caninos seropositivos a *T. cruzi* en tres cantones: Mora, Liberia y Golfito. Se recomienda realizar estudios sistemáticos y de amplia cobertura en Costa Rica, para determinar los cantones endémicos e informar a médicos veterinarios sobre los resultados obtenidos, para que tomen en cuenta la enfermedad de Chagas en el diagnóstico diferencial en perros que viven en zonas donde se han reportado caninos seropositivos a *T. cruzi*.

El segundo objetivo de la investigación, fue determinar por primera vez en la comunidad de Getsemaní, la aparición de nuevos casos de infección de *T. cruzi* en caninos durante un año, para así conocer si el ciclo del parásito se encuentra aún activo en dicha comunidad y caracterizar los genotipos o linajes de evolución presentes en esta localidad.

Se analizaron muestras de sangre de 55 caninos negativos a *T. cruzi* al inicio del estudio, en intervalos de tres a cuatro meses, mediante microscopia de luz, hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los caninos se dividieron en dos grupos: Grupo 1, el cual lo conformaron 25 perros viviendo en hogares, en donde se había determinado previamente la presencia del vector en el domicilio o peridomicilio; y Grupo 2, el cual lo conformaron 30 perros viviendo en hogares en los que no se habían hallado vectores en el domicilio o peridomicilio. En total, seis caninos (10.9%), todos pertenecientes al Grupo 1, seroconvirtieron durante el estudio en los primeros meses del año (época seca), manteniéndose seropositivos hasta el final de la investigación. Se determinó una incidencia de 24% de tripanosomiasis canina en el Grupo 1. Sólo uno de los seis caninos seropositivos resultó también positivo, una única vez, en la PCR de *T. cruzi*. El análisis de la secuencia de esta muestra, como las secuencias de *T. cruzi* amplificadas de los triatominos encontrados en las casas de los perros del Grupo 1, determinó a todas pertenecientes al linaje TcI. Se concluye que el ciclo de infección de *T. cruzi* se mantiene aún activo en la comunidad de Getsemaní, sobre todo en caninos que habitan en viviendas con reportes del vector en ellas. Se recomienda concientizar a los pobladores sobre la eliminación de los vectores en sus domicilios y peridomicilios.

Palabras claves

Trypanosoma cruzi, perros, anticuerpos, hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación, unidades discretas de tipificación (DTU), Costa Rica.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Historia, distribución y epidemiología

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una enfermedad causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, que puede infectar a humanos, animales domésticos y silvestres (Galvao & Justi, 2015).

Este protozoo fue descrito por primera vez en 1909, por el doctor Carlos Chagas, el cual encontró en una niña de dos años el parásito circulando en su sangre. Posteriormente, describió los signos clínicos de la enfermedad aguda y de la fase crónica, la cual se puede presentar décadas después de la primera inoculación del parásito (Steverding, 2014; Galvao & Justi, 2015).

La enfermedad de Chagas se encuentra distribuida en América Latina, donde se considera una enfermedad endémica. No obstante, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en las últimas décadas se ha presentado con mayor frecuencia en Estados Unidos, Canadá, en diversos países de Europa y algunos del Pacífico Occidental, debido a la migración de personas infectadas a estas zonas (Organización Mundial de la Salud, 2015).

En Centroamérica, la enfermedad de Chagas fue reportada por primera vez en humanos en el año 1913 en El Salvador. En 1931 se observó el primer caso en Panamá, en 1941 en Costa Rica, donde se encontraron triatomíneos en casas y se reportaron los primeros dos casos agudos de la enfermedad en humanos. En Nicaragua se reportó por primera vez en 1949 y en 1960 en Honduras (Pérez et al., 1984; Matamoros, 2002).

En caninos también se han reportado casos de tripanosomiasis en gran parte de América Latina y en Estados Unidos. Los métodos más usados para la detección de anticuerpos en caninos son las técnicas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el inmunoensayo enzimático (ELISA) (Saldaña et al., 2015; Dias-Perez et al., 2016; Curtis-Robles et al., 2017).

Los reportes de la presencia de *T. cruzi* en caninos, varían según cada país, y dentro de esos, según la zona analizada. En Panamá y Brasil se han realizado estudios con caninos de zonas rurales, en donde se encontraron un 17.6% y un 28.0% de caninos seropositivos para *T. cruzi*, respectivamente. También, en Estados Unidos se realizó un estudio con caninos utilizados para cacería y se determinó una seroprevalencia del 57.6% mediante IFI y un 19.6% mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saldaña et al., 2015; Dias-Perez et al., 2016; Curtis-Robles et al., 2017).

Sin embargo, la enfermedad de Chagas ha sido poco estudiada en Costa Rica, tanto en humanos como en caninos, y no se consideró como un problema prioritario de salud pública, hasta el año 2003, donde se estableció el tamizaje del 100% de las donaciones sanguíneas. La enfermedad de Chagas en humanos es de reporte obligatorio y la vigilancia epidemiológica de la enfermedad se realiza de forma pasiva (Norma de atención integral de la enfermedad de Chagas, 2012; Campos-Fuentes & Calvo-Fonseca, 2013). En contraste, la enfermedad de Chagas no es de reporte obligatorio en animales ni se ejecutan programas de vigilancia epidemiológica (Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), 2008).

Hasta la fecha, se han reportado casos en humanos en 5 provincias y 14 cantones de Costa Rica: en San José (Cantón Central, Escazú, Acosta, Santa Ana, Aserrí, Desamparados, Tibás, Pérez Zeledón, Alajuelita), Heredia (Barva), Alajuela (Cantón Central, Poás), Puntarenas (Cantón Central) y Guanacaste (Tilarán) (Matamoros, 2002; Ministerio de Salud, 2015).

Los casos de la enfermedad de Chagas en caninos de Costa Rica se han reportado en las mismas 5 provincias, pero solamente en 12 cantones: en San José (Santa Ana, Aserrí), Heredia (Cantón Central, San Isidro, San Rafael, Barva, Belén), Alajuela (Cantón Central, Poás, Atenas), Puntarenas (Esparza) y Guanacaste (Santa Cruz) (Berrocal-Avila et al., 1993; Montenegro et al., 2002; Villegas, 2008; Lizundia et al., 2014).

Los estudios serológicos en perros de Costa Rica son escasos, puntuales y no sistemáticos. Sobre todo, se han realizado en localidades en donde previamente se habían reportado casos clínicos de tripanosomiasis en caninos. En el 2002, se analizaron cinco localidades (Chilamate de Poás en Alajuela; San Rafael, San Isidro y Mercedes Norte en Heredia; y Santa Ana en San José) determinándose un 27.7% seropositivos mediante hemaglutinación indirecta (HAI), IFI y ELISA, y un 5.5% mediante xenodiagnóstico (Montenegro et al., 2002); mientras que en el 2008 se analizaron 31 y 60 perros, encontrándose un 19.3% y un 6.7% de perros seropositivos en los cantones de Aserrí y Santa Cruz, respectivamente (Villegas, 2008). En otro estudio realizado en el 2014 con 102 caninos de 8 comunidades endémicas, se estableció un 23.3% de perros seropositivos con HAI y un 8.8% positivos mediante un test rápido de amplificación molecular y detección oligocromatográfica (Lizundia et al., 2014). Finalmente, un estudio realizado en el 2015, en 177 viviendas de la comunidad de Getsemaní (cantones de Barva y San Rafael de Heredia), determinó 21 (11.9%) casas con chinches, y 14 (66%) casas con nidos de los triatominos, demostrando que el vector se encontraba establecido en las viviendas y representaba un riesgo de infección para los humanos y animales domésticos. Además, en el 55% de los chinches recolectados en estas viviendas, se detectó el parásito. En el caso de los caninos, se revisaron 289 perros, y se encontraron 22 (7.6%) seropositivos mediante HAI y 16 (5.5%) positivos mediante PCR (Dolz et al., 2015). Estos hallazgos señalan la importancia de continuar con estudios en zonas endémicas y aumentar la vigilancia epidemiológica en estas regiones tanto para los humanos como los animales.

Etiología

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Es un protozoo flagelado que pertenece a la clase Zoomastigophorea, orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae (Galvao & Justi, 2015). Presenta tres formas principales de vida, las cuales son el tripomastigoto, el amastigoto y el epimastigoto. El tripomastigoto es la forma infectante, la cual se va a encontrar circulando en la sangre del hospedador y en la región posterior del tracto digestivo del vector. El amastigoto es la forma intracelular obligada en el hospedador, la cual se va a replicar por fisión binaria dentro de las células infectadas.

El epimastigoto es la forma no infectiva y de replicación, que se encuentra dentro del vector y al igual que el tripomastigoto, es flagelado. Los tripomastigotos pueden parasitar una gran variedad de células, pero se encuentran generalmente en células del músculo (especialmente en el miocardio) y de la glía, en donde ingresan y cambian de forma para replicarse (Brener, 1973; Burleigh & Andrews, 1995).

Trypanosoma cruzi, presenta una gran variedad genética. Se han realizado extensos estudios del genoma nuclear, mitocondrial y del cinetoplasto los cuales fueron analizados para la reclasificación de las variantes de *T. cruzi*, en el segundo congreso satelital (Second Satellite Meeting, Zingales et al., 2009), con el propósito de generar consenso de la nomenclatura en la comunidad científica a nivel mundial. Hasta el momento se han descrito siete linajes de evolución, denominados Unidades Discretas de Tipificación (DTU, por su nombre en inglés Discrete Typing Units). Los linajes o DTU son: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y TcBat. Debido a las diferencias que existen entre estos linajes, se utilizan una gran variedad de protocolos de PCR para la amplificación de ADN de este agente, lo cual ha hecho que sea laborioso su identificación y caracterización genética (Muñoz-San Martín et al., 2017).

Transmisión

La principal vía de transmisión de la enfermedad de Chagas es la vectorial. También se puede transmitir por medio de transfusiones sanguíneas, por vía oral, por medio de la placenta, a través del canal de parto en el momento del nacimiento, por trasplantes de órganos, por contaminación de los alimentos y accidentes en laboratorios (Rodrigues, 2015).

Trypanosoma cruzi puede infectar a más de 100 especies de animales mamíferos. Los posibles reservorios naturales que se mencionan son animales silvestres tales como marsupiales, roedores, murciélagos, primates no humanos, carnívoros, armadillos; y como hospedadores el humano y animales domésticos tales como gatos, perros, ratas, conejos, cobayos, entre otros (Greene, 2012; Rodrigues, 2015).

En los animales silvestres es común la transmisión del agente por vía oral, ya que muchos se alimentan de insectos. Los perros y gatos jóvenes también pueden ingerir el insecto o las heces infectadas, principalmente al jugar con los insectos (Rodrigues, 2015).

Los vectores triatominos que transmiten la enfermedad de Chagas pertenecen al orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae. Son insectos hematófagos, principalmente nocturnos, que se alimentan de la sangre de humanos, animales silvestres y domésticos. Durante el día por lo general se encuentran escondidos en grietas o lugares oscuros (Zeledón et al., 2016).

Todas las especies de triatominos son potencialmente vectores de *T. cruzi*. Se han descrito alrededor de 144 especies, las cuales pertenecen a 5 tribus (*Aberproseniini*, *Bolboderini*, *Cavernicolini*, *Rhodniini* y *Triatomini*). Sin embargo, sólo alrededor de 20 especies se consideran importantes en el ciclo de transmisión de la enfermedad de Chagas. Los principales vectores en América Latina son las especies *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* y *Triatoma brasiliensis* (Galvao & Justi, 2015; Otálora-Luna et al., 2015).

Se han reportado 9 especies diferentes de triatominos que podrían ser vectores de *T. cruzi* en Costa Rica: *Belminus costaricensis*, *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus rufotuberculatus*, *Eratyrus cuspidatus*, *Rhodnius pallescens*, *T. dimidiata*, *Triatoma dispar*, *Triatoma nitida* y *Triatoma ryckmani* (Coscarón & Jirón, 1988; Zeledón, 2001).

En Costa Rica, el principal vector de la enfermedad de Chagas es *T. dimidiata*. Ha sido reportado en las siguientes provincias y cantones: en San José (Mora, Puriscal, Santa Ana, Escazú, Alajuelita, Curridabat, Acosta, Aserrí, Desamparados, Goicoechea, Montes de Oca, Tibás, Moravia, Pérez Zeledón, Turrubares y San José Centro), en Heredia (San Isidro, San Rafael, Barva, Santa Bárbara, Flores, Santo Domingo, Belén, San Pablo, Sarapiquí y Heredia Centro), en Alajuela (Orotina, San Mateo, Atenas, Poás, Palmares, San Carlos, Valverde Vega, Grecia, San Ramón, Alajuela Centro y Upala), en Cartago (La Unión y Paraíso), en Guanacaste (Nicoya, Cañas, Tilarán, La Cruz, Liberia, Carrillo, Santa Cruz, Bagaces y

Abangares), en Puntarenas (Montes de Oro, Esparza, Osa, Buenos Aires, Coto Brus, Garabito y Puntarenas Centro), y en Limón (Pococí y Limón Centro) (Zeledón, 1981; Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), 2017).

Patogénesis

La transmisión vectorial del *T. cruzi* a un hospedador susceptible sucede cuando el vector ingiere sangre con los tripomastigotos (forma infectiva). Una vez dentro del vector, los parásitos se transforman en epimastigotos (forma no infectiva), los cuales se van a replicar en la región anterior del tracto digestivo del vector. Finalmente, migran a la región posterior del tracto digestivo y se transforman en tripomastigotos metacíclicos (Brener, 1973; Burleigh & Andrews, 1995; Vianna et al., 2012). Cuando el vector se alimenta en un mamífero, defeca y en las excretas se van a encontrar los tripomastigotos metacíclicos. También, cuando el vector se alimenta, elimina varias enzimas que causan mucho prurito, el hospedador se rasará, lo que facilitará el ingreso de las formas infectantes de *T. cruzi* (Brener, 1973; Burleigh & Andrews, 1995).

En el hospedador, los tripomastigotos metacíclicos van a ser fagocitados por los macrófagos del tejido conectivo de la dermis o del tejido subcutáneo. Dentro de estas células perderán su flagelo y membrana ondulante, para convertirse en amastigotos y replicarse por medio de fisión binaria hasta provocar la lisis de las células. Aproximadamente 12 horas antes de salir de las células, los amastigotos se convierten en tripomastigotos, para poder moverse en el torrente sanguíneo y diseminarse, infectando diferentes tipos de tejidos celulares, tales como células musculares (especialmente las del corazón), epiteliales, neuronales, entre otras. Dentro de las células de los diferentes tejidos, también se van a encontrar amastigotos replicándose hasta provocar la lisis de las células, lo cual va ocasionando daño a los diferentes tejidos. Luego los tripomastigotos vuelven al torrente sanguíneo para infectar nuevas células (Brener, 1973; Burleigh & Andrews, 1995; Vianna et al., 2012). Cuando los tripomastigotos se encuentran en el torrente sanguíneo, pueden ser retomados por un vector triatomino al alimentarse, y así infectarlo para completar el ciclo biológico (Brener, 1973; Burleigh & Andrews, 1995).

Signos clínicos

El protozooario *T. cruzi* puede afectar a humanos y animales domésticos tales como gatos, perros, ratas, conejos, cobayos, entre otros. La presentación clínica de la enfermedad va a variar dependiendo de la cantidad de parásitos presentes en la infección inicial, el tipo de linaje del protozooario, la respuesta inmune del hospedador, la edad del individuo y el estado nutricional, entre otros factores (Rodrigues & Borges-Pereira, 2010).

Los signos clínicos que presentan los individuos infectados, tanto humanos como animales, se deben a la destrucción de las células y a una reacción inflamatoria. La enfermedad de Chagas presenta tres fases principales, una aguda, una fase indeterminada y una fase crónica (Rodrigues & Borges-Pereira, 2010; Ribeiro et al., 2012).

En la fase aguda, los humanos presentan en la mayoría de los casos, parasitemia y síntomas leves; además, una particular inflamación en la zona de inoculación, conocida como chagoma o signo de Romaña. En caso de presentarse una enfermedad aguda severa, se observa fiebre, adenopatía generalizada, esplenomegalia, hepatomegalia, miocarditis, meningoencefalitis, entre otros. Estos signos pueden resolverse o atenuarse dentro de las primeras 4 - 8 semanas. Las pruebas serológicas dan positivas alrededor de los 15 días post infección. Asimismo, se han reportado cambios leves en el ecocardiograma, mostrando una disfunción diastólica ventricular (Rodrigues & Borges-Pereira, 2010; Ribeiro et al., 2012).

La fase indeterminada puede durar en los humanos años y hasta décadas, en donde no muestran signos clínicos. Sin embargo, el parásito seguirá replicándose, hasta desencadenar la fase crónica. Esta fase se diagnostica generalmente mediante exámenes serológicos, ya que los individuos no muestran signos clínicos, ni cambios mayores en la ecografía o radiografía (Rodrigues & Borges-Pereira, 2010; Ribeiro et al., 2012).

La fase crónica se desarrollará en los humanos entre 10 a 30 años posterior a la infección inicial. Los signos clínicos se van a presentar de acuerdo con los órganos (corazón, esófago y colon, entre otros) afectados por el parásito. Los síntomas más comunes son arritmias, tromboembolias, miocarditis, meningoencefalitis, disnea, palpitaciones, bradicardia, desmayos, taquiarritmias y convulsiones, que pueden empeorar hasta producir un fallo cardíaco y muerte. Cerca del 5 al 8% de los individuos con infecciones crónicas presentan problemas digestivos como megaesófago y megacolon, que por lo general tienen buen pronóstico. Se presenta, debido a que el parásito afecta el plexo mesentérico y la inervación del tracto digestivo, lo que causa una disminución del peristaltismo y finalmente ocasiona el megaesófago o megacolon (Rodrigues & Borges-Pereira, 2010; Ribeiro et al., 2012).

En los caninos se presentan las mismas 3 fases de la enfermedad. La fase aguda ocurre mayormente en perros jóvenes, los cuales van a presentar signos clínicos inespecíficos como anorexia, membranas mucosas pálidas, tiempo de llenado capilar disminuido, pulso débil, y otros, que podrían ser más sugestivos de infección por *T. cruzi* como miocarditis, taquiarritmias, dificultad respiratoria y desmayos. En esta fase se pueden dar muertes súbitas debido a la falla cardíaca (Sousa et al., 2011; Greene, 2012). La fase indeterminada en caninos es similar a la de humanos, los individuos no van a presentar síntomas evidentes, sin embargo, al ejercitarlos, se podrían observar arritmias, dificultad respiratoria y muertes súbitas (Greene, 2012).

Los caninos que logran sobrevivir y llegar a la fase crónica pueden desarrollar anorexia, intolerancia al ejercicio, dificultad respiratoria, letargia, ascitis, hepatomegalia, esplenomegalia, congestión venosa yugular, bradicardia y otros signos clínicos relacionados con un fallo cardíaco crónico que es indicativo de una infección por *T. cruzi*. Esta fase puede durar en desarrollarse de 8 hasta 36 meses luego de la infección inicial. La sintomatología digestiva no ha sido descrita en caninos (Greene, 2012).

Diagnóstico

El diagnóstico presuntivo, tanto en humanos como en caninos se realiza mediante epidemiología, la historia clínica y los signos clínicos que se observen en la revisión clínica. (Abad-Franch et al., 2010; Greene, 2012). La confirmación se realiza mediante pruebas de laboratorio, ya sea mediante técnicas directas (detección del parásito) como la observación de una gota fresca de sangre o biopsias en microscopía de luz, aislamiento mediante cultivo celular o medios de cultivo líquidos enriquecidos, xenodiagnóstico o técnicas moleculares como la PCR; y mediante técnicas indirectas (detección de anticuerpos) como el ELISA, la HAI o la IFI (Vega & Náquira, 2006).

En la fase aguda es posible observar el parásito en la sangre mediante microscopía de luz, hasta 15 a 30 días post infección. A pesar de ello, esta técnica no permite determinar la especie de tripanosomátido infectante y es poco sensible (Siqueira-Batista, et al., 1994; Prats, 2006; Koneman et al., 2008; Abras et al., 2017).

Las pruebas serológicas son las pruebas de elección para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en humanos y caninos, ya que en los primeros 15 días post infección, aparecerán los anticuerpos, los cuales se podrán detectar durante el resto de sus vidas, o en caso de los humanos, hasta que reciban tratamiento y se controle la infección (Greene, 2012; Norma de atención integral de la enfermedad de Chagas, 2012).

Las pruebas serológicas más utilizadas para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* en humanos y caninos son el ELISA, la IFI y la HAI, las cuales detectan anticuerpos específicos de tipo IgG. Se recomienda utilizar dos técnicas serológicas para confirmar un resultado positivo. El inconveniente que presentan estas pruebas, es que pueden presentar reacción cruzada con especies de *Leishmania*, por lo que se recomienda identificar signos clínicos compatibles con infecciones de *T. cruzi* y recabar información sobre la zona de residencia (Vega & Náquira, 2006; Ribeiro et al., 2012; Bautista-López et al., 2016).

La PCR se considera una técnica directa con alta especificidad y sensibilidad comparada con el frotis (Telleria & Tibayrenc, 2010; Tanowitz & Weiss, 2017). Para la detección de *T. cruzi* se han amplificado y secuenciado diferentes regiones de diversos genes, ya que es un parásito que presenta una gran diversidad genética. También, se utiliza la PCR en Tiempo Real, con la cual es más sencillo diferenciar las diferentes cepas o linajes (Muñoz-San Martín et al., 2017). La amplificación de la región hipervariable del cinetoplasto (kDNA) detecta de manera certera la presencia de *T. cruzi* en las muestras de triatomíneos y sangre de mamíferos (Pinto et al., 2015), mientras que la amplificación de un segmento del gen 18S rRNA, permite establecer la especie y el linaje del tripanosoma infectante (Pinto et al., 2015; Aleman et al., 2017).

Otra técnica directa es el xenodiagnóstico, que consiste en utilizar triatomíneos libres del parásito y permitir que se alimenten de un individuo posiblemente infectado. Posteriormente, se examina el triatomíneo para observar si presenta los epimastigotos intracelulares o tripomastigotos en heces. Sin embargo, esta técnica tiene la desventaja de ser complicada de realizar en el laboratorio, se necesita personal especializado, depende de la parasitemia en el hospedador y puede durar de 30 a 60 días hasta encontrar las formas infectantes en las heces del vector. Debido a esto, esta técnica se utiliza con mayor frecuencia para fines investigativos (Siqueira-Batista, et al., 1994; Prats, 2006; Puerta Bula, 2007).

El aislamiento de *T. cruzi* mediante cultivo celular, se realiza con una gran variedad de células como VERO, CHO o RAW. En esta técnica se inocula la sangre del individuo infectado en células susceptibles. Los amastigotos o tripomastigotos se pueden observar entre 2 a 4 semanas post inoculación. Esta técnica no se utiliza como método diagnóstico de rutina, ya que solamente se puede realizar en laboratorios especializados con bioseguridad grado tres y personal capacitado. Además, el costo de la prueba es elevado y el resultado se obtiene después de algunas semanas (Siqueira-Batista, et al., 1994; Prats, 2006; Telleria & Tibayrenc, 2010).

También se utilizan medios de cultivo líquidos enriquecidos, en donde se pueden cultivar los parásitos, como por ejemplo el NNN, Tobie, Senekjie, Warren, LIT, Boné y Parent, entre otros (Basso et al., 1980). Una de sus más importantes aplicaciones, es el mantenimiento de los parásitos en crecimiento por mucho tiempo, para poder ser utilizados en otras pruebas como por ejemplo en la IFI. Estos cultivos son de bajo costo y de fácil preparación (Montealegre, 2016).

Prevención, control y tratamiento

El control y la prevención de la enfermedad de Chagas se enfoca en disminuir la población de vectores, y evitar el contacto de los mismos con humanos y caninos. Las campañas de eliminación de vectores han logrado la reducción de la transmisión de la enfermedad. No obstante, puede volver a ocurrir una repoblación de vectores, por lo que es importante controlar permanentemente el hábitat domiciliar y peridomiciliar, y especialmente evitar la acumulación de madera y otros materiales cerca o dentro de la casa, que puedan brindar refugio a los vectores. También, se recomienda realizar periódicamente la búsqueda activa de nidos en el domicilio y peridomicilio (De Figueiredo Diniz et al., 2010; Galvao & Justi, 2015). Los cambios en el manejo ambiental de casas infestadas con triatomíneos han sido exitosos y resultan ser una buena manera de control permanente, menos costosa, más sustentable y realista, que el utilizar insecticidas (Zeledón et al., 2008).

Otros métodos de control, son el evitar el uso de luces en el área peridomiciliar (para no atraer a los vectores), no permitir que las mascotas duerman fuera de la casa e impedir las plagas de animales sinantrópicos, que podrían ser fuente de alimento para los vectores. En algunos casos se recomienda también el uso de collares con pesticidas en los caninos, para evitar que los triatomíneos se alimenten de ellos (Abad-Franch et al., 2010; Greene, 2012).

En países endémicos se recomienda evaluar rutinariamente a los perros, ya que se consideran uno de los principales hospedadores domésticos de la enfermedad, y en condiciones naturales éstos son infectados con mayor frecuencia que los humanos, por lo que pueden ser utilizados como centinelas para estimar las infecciones en humanos (Abad-Franch et al., 2010; Barbabosa-Pliego et al., 2011; Greene, 2012; Castillo-Neyra et al., 2015).

Los medicamentos más utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas en humanos son el Nifurtimox y el Benznidazol, que son agentes antiparasitarios. Estos medicamentos logran disminuir la parasitemia en los individuos, aunque, tienen cierto efecto tóxico y efectos secundarios como dolor de cabeza, pérdida de concentración, anorexia, vómito, entre otros. El tratamiento funciona mejor, cuando es aplicado en la fase aguda de la enfermedad, ya que en la fase crónica existe daño en los tejidos que no puede ser reparado; además, el parásito es más difícil de eliminar conforme avanza la enfermedad (Da Matta Guedes et al., 2004; Abad-Franch et al., 2010; De Figueiredo Diniz et al., 2010).

En caninos la administración de tratamiento es controversial, debido a que no existen presentaciones de los medicamentos contra *T. cruzi* para medicina veterinaria. Se han realizado estudios experimentales que demuestran que la administración de Nifurtimox y Benznidazol en caninos provocan una serie de efectos secundarios como por ejemplo vómito, náuseas, convulsiones, entre otros, debido a la toxicidad que presentan dichos medicamentos en los caninos (Greene, 2012). Un estudio demostró que el Benznidazol lograba disminuir la carga parasitaria inicialmente, sin embargo, post tratamiento se observó un aumento progresivo de la carga parasitaria en los caninos estudiados (Santos et al., 2016).

Debido a esto, se recomienda tratar a los caninos que presenten sintomatología cardíaca con terapias de soporte y diuréticos, asimismo con medicación para la función cardíaca y broncodilatadores, entre otros. El pronóstico en animales es reservado, ya que por lo general desarrollan la fase crónica y mueren súbitamente (Greene, 2012).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abad-Franch, F., Santos, W.S. & Schofield, C.J. (2010). Research needs for Chagas disease prevention. *Acta Trop.* 115(1), 44-54.
- Abras, A., Muñoz, C., Ballart, C., Berenguer, P., Llovet, T., Herrero, M., Tebar, S., Pinazo, M.J., Posada, E., Martí, C., Fumadó, V., Bosch, J., Coll, O., Juncosa, T., Ginovart, G., Armengol, J., Gascón, J., Portús, M. & Gállego, M. (2017). Towards a new strategy for the diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, JCM-02248.
- Aleman, A., Guerra, T., Maikis, T.J., Milholland, M.T., Castro-Arellano, I., Forstner, M.R.J. & Hahn, D. (2017). The Prevalence of *Trypanosoma cruzi*, the Causal Agent of Chagas Disease, in Texas Rodent Populations. *EcoHealth*. 14(1), 130-143.
- Barbabosa-Pliego, A., Campos, P., Olivares, D., Aparicio-Burgos, J.E., Montes de Oca-Jiménez, R., Martínez-Castañeda, J.S., Ochoa-García, L., Guzmán-Bracho, C., Estrada Franco, J.G, Garg, N.J. & Vazquez, J.C. (2011). Prevalence of *Trypanosoma cruzi* in dogs (*Canis familiaris*) and triatomines during 2008 in a sanitary region of the State of Mexico, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 11(2), 151-156.
- Basso, B., Moretti, E.R. & Dominguez, M. (1980). Cultivo de *T. cruzi* en medio monofásico con aireación para la obtención de antígenos. *Medicina (Buenos Aires)*. (4), 428-432.
- Bautista-López, N. L., Ndao, M., Vázquez F., Nara, T., Annoura, T., Hardie, D. B., Borchers, C.H. & Jardim, A. (2016). Characterization and diagnostic application of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote excreted-secreted antigens shed in extracellular vesicles released from infected mammalian cells. *Journal of Clinical Microbiology*, JCM-01649.

- Berrocal-Avila, A., Morales-Acuña, J.A., Cordero, V., & Villalobos, C. (1993). Miocarditis aguda chagásica en caninos de Costa Rica. Acute myocarditis due to *Trypanosoma cruzi* in dogs in Costa Rica. *Revista de Ciencias Veterinarias (Heredia)*. 15(1), 51-59.
- Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* (27), 347-382.
- Burleigh, B.A. & Andrews, N.W. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* (49), 175-200.
- Campos- Fuentes, E. & Calvo-Fonseca, N. (2013). Confirmación diagnóstica del tamizaje de enfermedad de Chagas en Costa Rica. *Rev Costarr Pública*. (22), 4-8.
- Castillo-Neyra, R., Chou Chu, L., Quispe-Machaca, V., Ancca-Juarez, J., Chavez Malaga, F.S., Bastos Mazuelos, M., Naquira, C., Bern, C., Gilman, R.H. & Levy, M.Z. (2015). The potential of canine sentinels for reemerging *Trypanosoma cruzi* transmission. *Prev. Vet. Med.* 120(3), 349-356.
- Coscarón, M & Jirón, L.F. (1988). Update checklist of assassin bug species (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by random amplification of polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction. *J. Med. Entomol.* (41), 882-887.
- Curtis-Robles, R., Snowden, K.F., Dominguez, B., Dinges, L., Rodgers, S., Mays, G. & Hamer, S.A. (2017). Epidemiology and molecular typing of *Trypanosoma cruzi* in naturally-infected hound dogs and associated triatomine vectors in Texas, USA. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 11(1), e0005298.
- Da Matta Guedes, P.M., Urbina, J.A., de Lana, M., Afonso, L.C., Veloso, V.M., Tafuri, W.L., Machado-Coelho, G.L., Chiari, E. & Bahia, M.T. (2004). Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(11), 4286-4292.

- De Figueiredo Diniz, L., Santana Caldas, I., da Matta Guedes, P.M., Crepalde, G., de Lana, M., Martins Carneiro, C., Talvani A., Urbina, J.A. & Bahia, M.T. (2010). Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54(7), 2979-2986.
- Dias-Perez, T., Borges-Figueiredo, F., Mendes, A.A., Laurentino-Silva, V., Madeira, M.D.F., Pecanha-Brazil, R. & Rodrigues-Coura, J. (2016). Prevalence of American trypanosomiasis and leishmaniasis in domestic dogs in a rural area of the municipality of São João do Piauí, Piauí state, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo*. 58(79), 1-6.
- Dolz, G., Urbina, A., Herrero, M., Mendoza, N., Argüello, M. y Madrigal, V. (2015). Distribución del *Trypanosoma cruzi* usando como indicadores su presencia en perros y en vectores. San José, C.R. Colegio de Periodistas de Costa Rica. Oct. 10.
- Galvao, C & Justi, S.A. (2015). An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Trop.* (151), 116-125.
- Greene, C. (2012). *Infectious diseases of the dog and cat*. 4 ed. United States, Elsevier.
- Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio). (2017). Base de datos de especímenes (Atta), Ficha de especies. [en línea]: *Triatoma dimidiata*, Especímenes y observaciones. <http://www.crbio.cr:8080/neoportall-web/?q=triatoma%20dimidiata> (Consulta: 01 may. 2017).
- Koneman, E.W., Allen, S., Winn, W., Janda, W.M., Procop, G.W., Schreckenberger, P.C. & Woods, G.L. (2008). *Koneman, Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en color*. 6ª ed. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España.

- Lizundia, R., Picado, A., Cordero, M., Calderon, A., Deborggraeve, S., Montenegro, V. M., & Urbina, A. (2014). Molecular and serological rapid tests as markers of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs in Costa Rica. *Tropical Parasitology*. 4(2), 111.
- Matamoros, X. (2002). Caracterización por Biodemas y Zimodemas de cepas de *Trypanosoma cruzi*, circulantes en zonas endémicas de las Repúblicas de Nicaragua y Costa Rica. Tesis de maestría en Enfermedades Tropicales, para optar por el título de *Magister Scientiae*. Universidad Nacional. Costa Rica.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). (2008). Listado de enfermedades animales de declaración obligatoria. Decreto No 34669-MAG. Presidencia de la República y Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica.
- Ministerio de Salud (2015). Memoria Institucional 2014. San José, Costa Rica, El Ministerio.
- Montealegre Santa, I.A. (2016). Importancia de los medios de cultivo en el diagnóstico de leishmaniasis. Colombia. *Editorial Nova*. 8(14), 128-132.
- Montenegro, V.M., Jimenez, M., Dias, J.C. & Zeledon, R. (2002). Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (97), 491-494.
- Muñoz-San Martín, C., Apt, W. & Zulantay, I. (2017). Real-time PCR strategy for the identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units directly in chronically infected human blood. *Infection, Genetics and Evolution*. (49), 300-308.
- Norma de atención integral de la Enfermedad de Chagas. (2012). Decreto Ejecutivo N° 37269-S. Presidencia de la República y Ministerio de Salud. Gobierno de Costa Rica.
- Organización Mundial de la Salud. (2015). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). N° 340. Marzo 2015.

- Otálora-Luna, F., Pérez-Sánchez, A.J., Sandoval, C. & Aldana, E. (2015). Evolution of hematophagous habit in Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). *Revista Chilena de Historia Natural*. 88(4).
- Pérez, F., Vargas, L.G., Fernández, O. & Velásquez, R. (1984). Enfermedad de Chagas Aguda: reporte de tres casos tratados con Nifurtimox®. *Acta Med. Costarric.* (27), 94-101.
- Pinto, C.M., Ocaña-Mayorga, S., Tapia, E.E., Lobos, S.E., Zurita, A.P., Aguirre-Villacís, F., MacDonald, A., Villacís, A.G., Lima, L., Teixeira, M.M.G., Grijalva, M.J. & Perkins, S.L. (2015). Bats, Trypanosomes, and Triatomines in Ecuador: new insights into the diversity, transmission, and origins of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. *Plos One*. 10(10), 1-13.
- Prats, G. (2006). *Microbiología clínica*. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España.
- Puerta Bula, C.J. (2007). *Parásito, Genoma y Biología: aproximación molecular al estudio de Trypanosoma rangeli y su relación con Trypanosoma cruzi*. Bogotá. Colombia. Editorial Pontificia Universidad Javeriana.
- Ribeiro, A.L., Nunes, M.P., Teixeira, M.M. & Rocha, M.O. (2012). Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*. 9(10), 576-589.
- Rodrigues, J. (2015). The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions – A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 110(3), 277-282.
- Rodrigues, J. & Borgues-Pereira, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its Discovery. A systemic review. *Acta Trop.* (115), 5-13.

- Saldaña, A., Calzada, J.E., Pineda, V., Perea, M., Rigg, C., González, K., Santamaria, A.M., Gottdenker, N.L. & Chaves, L.F. (2015). Risk factors associated with *Trypanosoma cruzi* exposure in domestic dogs from a rural community in Panama. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110(7), 936-944.
- Santos, F.M., Mazzeti, A.L., Caldas, S., Goncalves, K.R., Lima, W.G., Torres, R.M. & Bahia, M.T. (2016). Chagas cardiomyopathy: The potential effect of benznidazole treatment on diastolic dysfunction and cardiac damage in dogs chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. (161), 44-54.
- Siqueira-Batista, R., Meneses Quintas, L.E. & Storino, R.A. (1994). Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*. 41(527), 69-75.
- Sousa, M.G., Paulino-Junior, D., Pascon, J.P.E., Pereira-Neto, G.B., Carareto, R., Champion, T. & Camacho, A.A. (2011). Cardiac function in dogs with chronic Chagas cardiomyopathy undergoing autologous stem cell transplantation into the coronary arteries. *The Canadian Veterinary Journal*. 52(8), 869-874.
- Steverding, D. (2014). The history of Chagas disease. *Parasites and Vectors*. (7), 317.
- Tanowitz, H.B. & Weiss, L.M. (2017). A New Development in *Trypanosoma cruzi* Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, JCM-02353.
- Telleria, J. & Tibayrenc, M. (2010). *American trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research*. Elsevier.
- Vega, S. & Náquira, C. (2006). *Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Tripanosomiasis americana (Enfermedad De Chagas)*. Inst Nac de Salud. Lima. Perú.

- Vianna Martins, A., Gomes A.P., Gomes de Mendonça E., Lopes Rangel Fietto J., Santana L.A., De Almeida Oliveira, M.G., Geller, M., De Freitas Santos, R., Roger Vitorino, R. & Siqueira-Batista, R. (2012). Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio*. 16(1), 45-58.
- Villegas, A. (2008). Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en perros de dos zonas rurales con altos y bajos índices de infestación por *Triatoma dimidiata*. Tesis para optar por el grado académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional. Costa Rica.
- Zeledón, R. (1981). El *Triatoma dimidiata* y su relación con la enfermedad de Chagas. Editorial Universidad Estatal a distancia. San José. Costa Rica.
- Zeledón, R. (2001). Una estrategia para el control de la enfermedad de Chagas en Costa Rica y su relación con programas similares en los otros países centroamericanos. San José. Costa Rica, INCIENSA.
- Zeledón, R., Rojas, J.C., Urbina, A., Cordero, M., Gamboa, S.H., Lorosa, E.S. & Alfaro, S. (2008). Ecological control of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): five years after a Costa Rican pilot project. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103(6), 619-621.
- Zeledón, R., Hanson, P. & Zumbado, M. (2016). Guía de artrópodos de importancia médica y veterinaria. Editorial Universidad Estatal a distancia. San José. Costa Rica.
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M. & Schijman, A.G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051-1054.

ARTÍCULO I

DetECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Trypanosoma cruzi* EN CANINOS DE COSTA RICA

Resumen

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad zoonótica producida por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, el cual puede infectar a humanos, animales domésticos y silvestres. En Costa Rica sólo se han realizado estudios sobre tripanosomiasis canina en 12 de un total de 82 cantones, encontrándose en todos los cantones estudiados caninos infectados con *T. cruzi*. El objetivo de la presente investigación fue determinar la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en 427 caninos provenientes de 28 cantones de Costa Rica, para determinar la seroprevalencia de *T. cruzi* en caninos del país, y determinar si los caninos seropositivos, se presentan únicamente en cantones donde se ha reportado previamente el vector y el parásito en perros, o si se presentan casos en otros cantones del país aún no investigados. Las muestras de suero canino se analizaron mediante las pruebas de hemaglutinación indirecta (HAI) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Un total de cinco caninos (1.17%) resultaron positivos, provenientes de cuatro cantones distintos (Mora, San Rafael de Heredia, Liberia y Golfito), la seroprevalencia determinada a nivel nacional fue 1.17%. Se determinó, por primera vez, la presencia de caninos seropositivos a *T. cruzi* en tres cantones: Mora, Liberia y Golfito. Se recomienda realizar estudios sistemáticos y de amplia cobertura en Costa Rica, para determinar los cantones endémicos e informar a médicos veterinarios sobre los resultados obtenidos, para que se tome en cuenta la enfermedad de Chagas como un diagnóstico diferencial, en perros que viven en zonas donde se han reportado casos de tripanosomiasis canina.

Palabras claves

Trypanosoma cruzi, anticuerpos, perros, hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI), Costa Rica.

Abstract

Chagas disease or American trypanosomiasis is a zoonotic infection caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which can infect humans, domestic and wild animals. Studies of canine trypanosomiasis in Costa Rica have been carried out in 12 of a total of 82 counties, and canines infected with *T. cruzi* were found in all counties studied. The objective of the present investigation was to determine the presence of antibodies against *T. cruzi* in 427 canines from 28 counties of Costa Rica, to determine the seroprevalence of *T. cruzi* in canines of the country, and to determine if the seropositive canines were present only in counties where the vector and the parasite in dogs has been previously reported, or if the cases occurred in other counties of the country not yet investigated. Canine serum samples were analyzed by indirect hemagglutination (IHA) and indirect immunofluorescence (IFA) tests. A total of five canines (1.17%) from four different counties (Mora, San Rafael de Heredia, Liberia and Golfito) were positive, the national seroprevalence determined was 1.17%. The presence of *T. cruzi* seropositive canines was established for the first time in three counties: Mora, Liberia and Golfito. It is recommended to carry out systematic studies, to determine the endemic counties in Costa Rica and inform veterinarians about the results obtained, so they may consider Chagas disease as a differential diagnosis in dogs that live in areas where cases of canine trypanosomiasis have been reported.

Keywords

Trypanosoma cruzi, antibodies, dogs, indirect hemagglutination (IHA), indirect immunofluorescence (IFA), Costa Rica.

1. Introducción

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad zoonótica producida por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, el cual puede infectar a humanos, animales domésticos y silvestres (Galvao & Justi, 2015). Es considerada una de las enfermedades parasitarias más importantes en América y de gran importancia para la salud pública. Se estima que alrededor de 8 millones de personas en América Latina se encuentran infectadas por *T. cruzi* y 110 millones se encuentran en riesgo de contraer la infección (Barbabosa-Pliego et al., 2011; Greene, 2012). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta 21 países de América Latina como endémicos para la enfermedad de Chagas, y entre ellos se encuentra Costa Rica (Organización Mundial de la Salud, 2017).

En América, se han realizado diferentes estudios serológicos en caninos. El estado en el cual se ha reportado una mayor cantidad de caninos infectados en Estados Unidos fue Texas, entre 3.6 – 57.6%, según la población estudiada. También se han reportado perros infectados en los estados de Louisiana, Oklahoma, Tennessee y Virginia (Meyers et al., 2017). En México se han determinado seroprevalencias de *T. cruzi* en caninos desde 0.34% hasta 34%, dependiendo de la zona en estudio (Arce-Fonseca et al., 2017). En Panamá y Brasil se han realizado estudios con caninos de zonas rurales en donde se encontraron un 17.6% y un 28% de caninos seropositivos para *T. cruzi*, respectivamente (Saldaña et al., 2015; Dias-Perez et al., 2016).

En 1941 se reportaron por primera vez dos casos agudos de tripanosomiasis en humanos en Costa Rica, desde entonces se han reportado diversos casos de tripanosomiasis humana en cinco de las siete provincias de Costa Rica (San José, Heredia, Alajuela, Puntarenas y Guanacaste) (Pérez et al., 1984; Matamoros, 2002; Ministerio de Salud, 2015). Desde el 2003, se realiza el tamizaje del 100% de las donaciones sanguíneas de Costa Rica para la enfermedad de Chagas; y en el 2013 se reportó un 0.07% de anticuerpos contra *T. cruzi* en los donadores de sangre (Campos-Fuentes & Calvo-Fonseca, 2013).

La utilización de pruebas serológicas para el diagnóstico de infecciones por *T. cruzi* en humanos y caninos es lo más recomendable, ya que los anticuerpos están presentes en el hospedador durante toda la vida o durante el tiempo de infección (Tenney et al., 2014). Las técnicas más utilizadas son el inmunoensayo enzimático (ELISA), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la hemaglutinación indirecta (HAI). Se recomienda usar al menos dos técnicas serológicas para confirmar los individuos positivos (Nieto et al., 2009).

Los perros se consideran uno de los hospedadores domésticos más importantes de esta enfermedad zoonótica, y en condiciones naturales son infectados con mayor frecuencia que los humanos, por lo que pueden ser utilizados como centinelas para estimar las infecciones en humanos (Barbabosa-Pliego et al., 2011; Castillo-Neyra et al., 2015).

En Costa Rica sólo se han realizado estudios serológicos puntuales en caninos de zonas donde previamente se había reportado el vector o se conocía de la existencia de casos de tripanosomiasis canina, lo cual, no refleja la situación actual de la infección en caninos en el país. Hasta la fecha se han realizado estudios en 12 de los 50 cantones del país, en los que se ha reportado la presencia del *Triatoma dimidiata* (Montenegro et al., 2002; Villegas, 2008; Lizundia et al., 2014). En todos los 12 cantones se encontraron caninos seropositivos (Cuadro 1), las seroprevalencias determinadas fluctuaron entre 6.7% y 27.7% (Montenegro et al., 2002; Villegas, 2008; Lizundia et al., 2014).

El último estudio en caninos se realizó en el año 2015 en la comunidad de Getsemaní, donde participaron 177 viviendas, encontrándose 21 (11.9%) casas con chinches. De éstas, 14 (66%) tenían nidos de los triatominos en el domicilio o peridomicilio, demostrándose así el establecimiento del vector en las viviendas, lo cual representa un riesgo de infección para los humanos y animales domésticos. Igualmente, se detectó el parásito en un 55% de los chinches recolectados en estas viviendas. En el caso de los caninos, se revisaron 289 perros, y se encontraron 22 (7.6%) positivos para HAI y 16 (5.5%) positivos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Dolz et al., 2015).

Cuadro 1. Estudios serológicos de *T. cruzi* realizados previamente en caninos de Costa Rica

Año	Cantones	Resultados	Referencia
2002	Poás, San Isidro (Heredia), San Rafael (Heredia), Heredia Centro y Santa Ana	27.7% (15/54) IFI, ELISA y HAI 5.5% (3/54) xenodiagnóstico	Montenegro et al., 2002
2008	Aserri y Santa Cruz	HAI e IFI 19.3% (6/31) y 22.6% (7/31) 6.7% (4/60) y 10% (6/60)	Villegas, 2008
2014	Atenas, Alajuela Centro, San Rafael (Heredia), Getsemaní (Barva), Aserri y Esparza	23.3% (21/90) Kit serológico 8.8% (9/102) Técnica molecular	Lizundia et al., 2014
2015	Getsemaní (Barva y San Rafael de Heredia)	22/289 (7.6%) HAI 16/289 (5.5%) PCR	Dolz et al., 2015

La presente investigación pretendió ampliar el conocimiento sobre la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en caninos de Costa Rica, sobre todo establecer la prevalencia a nivel nacional, y determinar la presencia de infecciones en perros, en cantones del país donde no se habían realizado estudios previos en caninos o reportado previamente la presencia de triatominos.

2. Metodología

2.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional, transversal y descriptivo para determinar la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en 427 caninos de Costa Rica.

2.2 Procedencia, tipo y tamaño de la muestra

Las muestras que se utilizaron para el estudio procedían de un banco de sueros de 427 caninos, los cuales fueron recolectados entre junio del 2011 y mayo del 2014, en el marco del proyecto “Diagnóstico molecular de agentes infecciosos en garrapatas y de animales domésticos de distintas áreas recreativas de Costa Rica” (Barrantes-González et al., 2016a), con el objetivo de detectar agentes infecciosos transmitidos por vectores, y que se encontraban debidamente almacenadas a -20°C en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

El cálculo de la muestra se basó en una población total de 1 939 142 perros en el país, ya que estudios determinaron que en promedio existen en cada vivienda 1.6 perros, y para el 2011 había un total de 1 211 964 viviendas ocupadas en Costa Rica, de las cuales se encontraban el 33.1% en San José, 19.5% en Alajuela, 10.8% en Cartago, 10.1% en Heredia, 9.8% en Puntarenas, 9.0% en Limón y 7.6% en Guanacaste (List, 2009; Fuprovi, 2012; INEC, 2012; Sociedad Mundial para la Protección Animal, 2012). El cálculo se realizó por medio del programa WinEpiscope 2.0, con una prevalencia mínima estimada del 6% para *T. cruzi* (Montenegro et al., 2002; Villegas, 2008; Lizundia et al., 2014), y con un nivel de confianza del 95%, obteniéndose un tamaño de muestra estimado de 300 animales.

Sin embargo, para darle más validez a la muestra, se analizaron un total de 427 sueros de caninos, 158 de San José (37%), 35 de Alajuela (8.2%), 26 de Cartago (6.1%), 27 de Heredia (6.3%), 60 de Puntarenas (14.0%), 44 de Limón (10.3%) y 77 de Guanacaste (18%).

Los perros que se analizaron provenían de 28 cantones: Central de Alajuela (19), San Carlos (16), Central de Cartago (18), El Guarco (4), La Unión (2), Oreamuno (2), Cañas (42), Liberia (35), Central de Heredia (6), San Pablo (2), San Rafael (16), Santo Domingo (3), Central de Limón (22), Pococí (22), Garabito (28), Golfito (32), Alajuelita (3), Aserrí (17), Central de San José (47), Curridabat (1), Desamparados (45), Escazú (11), Montes de Oca (2), Mora (23), Moravia (1), Santa Ana (1), Tibás (5), Vázquez de Coronado (2).

De estos 28 cantones, 21 contaban con antecedentes de presencia del vector y siete (Vázquez de Coronado, Cartago Centro, Oreamuno, El Guarco, Golfito, Garabito y Limón Centro) no poseían reportes previos de la presencia del vector.

2.3 Recolecta de datos

De cada uno de los sueros se contó con la información del propietario (nombre, dirección, provincia, cantón, teléfono y correo electrónico), la información de cada canino (nombre, raza, sexo, edad, si habita dentro del hogar y si habita con otros animales), y signos clínicos observados en el pasado (anorexia, membranas mucosas pálidas, intolerancia al ejercicio, letargia, desmayos, ascitis, arritmias, dificultad respiratoria, entre otros), como también, los resultados de la revisión clínica el día de la toma de la muestra (condición corporal, actitud, color de las membranas mucosas, tiempo de llenado capilar, temperatura, presencia de ectoparásitos y signos clínicos observados en ese momento) (Anexo 1).

De los 427 caninos analizados en este estudio, 219 fueron hembras y 208 machos, 187 fueron cachorros (1 – 12 meses), 201 se encontraban entre los 2 a 7 años (adultos) y 39 caninos entre los 8 a 15 años (geriátricos). La mayoría (234) fueron perros sin raza definida (SRD) y 193 de raza (American Pitbull Terrier, American Staffordshire Terrier, Beagle, Bichón Habanero, Bichón Maltés, Boxer, Bull Terrier Inglés, Bulldog Inglés, Caniche, Chihuahua, Cocker Spaniel Inglés, Collie, Dálmata, Dóberman, Golden Retriever, Husky Siberiano, Labrador Retriever, Pastor Alemán, Pequinés, Pinscher Miniatura, Pomerano, Rottweiler, Samoyedo, Schnauzer miniatura, Shih Tzu, Weimaraner, West Highland White Terrier y Whippet).

2.4 Análisis serológico

Todas las 427 muestras de suero canino se sometieron a las pruebas de HAI e IFI. Para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* mediante HAI se utilizó el kit comercial “Chagatest HAI” de Laboratorios Wiener (Rosario, Argentina). La HAI se realizó según el protocolo recomendado por los fabricantes. Las muestras que resultaron positivas en la dilución 1:16 fueron consideradas positivas, y se sometieron de nuevo a la HAI con diluciones seriadas (1:16 hasta 1:4096) para determinar el título final de cada muestra.

Para la IFI se prepararon las láminas en el Laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. Para esto, se tomó un cultivo de epimastigotos de *T. cruzi* en fase exponencial de crecimiento en medio líquido de LIT (Infusión de hígado y triptona). Se colocó 25 µl en cada uno de los pocillos de las láminas de IFI, en una dilución de 1.3×10^6 parásitos por ml en solución de Locke. Las láminas se dejaron secar en la estufa a 37°C durante 15 minutos, se fijaron con acetona pura por 2 minutos y se conservaron a -20°C hasta continuar con el procesamiento.

Para realizar la IFI, se diluyeron los sueros 1:32 en Buffer Fosfato Salino (PBS) y se colocaron 25 µl en forma individual en los pocillos de las láminas. Como controles, se utilizaron sueros caninos previamente identificados en el Laboratorio de Zoonosis como negativos o positivos. En cada lámina se utilizó un pocillo para cada control. Las láminas se incubaron por 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda, seguidamente se lavó 2 veces con PBS por 10 minutos y se agregó el conjugado (anti IgG perro – fluoresceína, 0855325 de MP Biomedicals®). Se volvió a incubar por 30 minutos a 37°C en la cámara húmeda, se realizaron otros 2 lavados con PBS y se observó las láminas en microscopio de inmunofluorescencia. Los sueros que mostraron fluorescencia en la dilución 1:32 se consideraron positivos y se sometieron nuevamente a la IFI (diluciones 1:32 hasta 1:4096) para determinar el título final.

3. Resultados

Del total de 427 sueros caninos analizados, resultaron positivos en HAI e IFI cinco (1.17%) y negativos 422 (98.83%) (Figura 1 y 2). Los sueros positivos mostraron títulos entre 1:128 y 1:1024 en las dos pruebas (Cuadro 2).

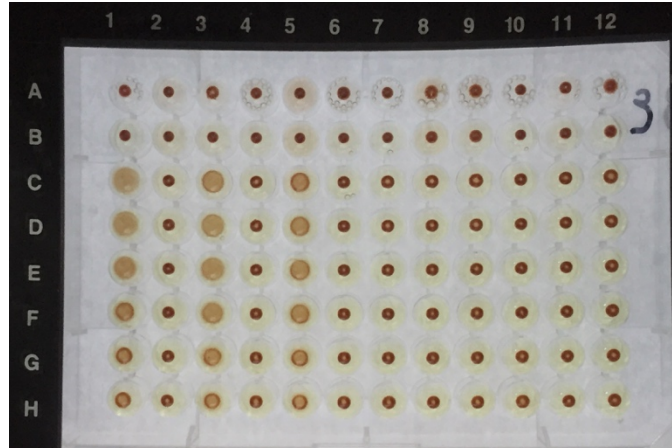


Figura 1. Reacciones positivas (columnas 1, 3 y 5) y negativas (restantes columnas) de sueros caninos en la HAI de *T. cruzi* (1: Control +, 12: Control -)

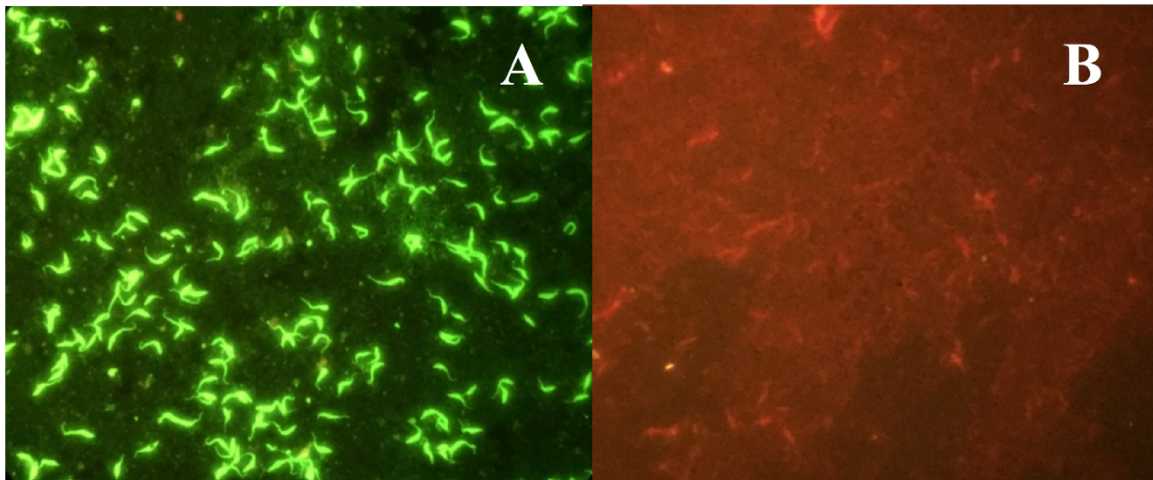


Figura 2. Reacción positiva (A) y negativa (B) de sueros caninos en la IFI de *T. cruzi*

En el Cuadro 2, se muestran los títulos de anticuerpos detectados en HAI e IFI, provincia y cantón en el que vivían los caninos seropositivos, así como información sobre reportes previos de casos de tripanosomiasis en caninos o reportes previos de la presencia del vector en el cantón.

Cuadro 2. Títulos de anticuerpos y procedencia de los caninos seropositivos a *T. cruzi*

Canino	HAI Título	IFI Título	Provincia	Cantón	Reportes previos de:	
					vectores en el cantón	caninos con <i>T. cruzi</i>
1	+ (1:1024)	+ (1:1024)	Heredia	San Rafael	Sí ¹	Sí ^{2,3,4}
2	+ (1:1024)	+ (1:512)	San José	Mora	Sí ¹	No
3	+ (1:256)	+ (1:256)	San José	Mora	Sí ¹	No
4	+ (1:1024)	+ (1:1024)	Puntarenas	Golfito	No	No
5	+ (1:128)	+ (1:128)	Guanacaste	Liberia	Sí ¹	No

¹ Zeledón, 1981; ² Montenegro et al., 2002; ³ Lizundia et al., 2014; ⁴ Dolz et al., 2015

Las características y hallazgos en la revisión clínica de los cinco caninos positivos en HAI e IFI de *T. cruzi* se muestran en el Cuadro 3. En el momento de la revisión clínica, los cinco caninos positivos se encontraban alerta, eran dóciles y presentaron temperatura, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, sonidos cardíacos y llenado capilar dentro de los rangos normales. Ninguno de los cinco caninos, presentó el día de la revisión clínica signos clínicos compatibles con la infección por *T. cruzi* como por ejemplo tos, ascitis, intolerancia al ejercicio, letargia, desmayos, arritmias o dificultad respiratoria. Tampoco los propietarios observaron dichos signos clínicos en sus animales con anterioridad.

Cuadro 3. Características de los cinco caninos seropositivos para *T. cruzi*

Canino	Raza	Sexo	Edad (años)	Talla	Membranas mucosas	Condición corporal	Permanencia fuera o dentro del hogar
1	SRD	Hembra	1	Mediano	Muy pálidas	Buena	Fuera
2	French Poodle	Hembra	0.5	Pequeño	Rosadas	Buena	Dentro
3	French Poodle	Macho	1	Pequeño	Rosadas	Buena	Dentro
4	SRD	Macho	4	Mediano	Pálidas	Regular	Fuera
5	SRD	Macho	5	Pequeño	Rosadas	Buena	Fuera

SRD: sin raza definida

En cuatro (14.3%) del total de 28 cantones analizados se determinaron perros seropositivos a *T. cruzi*. En tres cantones (Golfito, Mora y Liberia) se encontraron perros seropositivos por primera vez en Costa Rica, mientras que en uno (San Rafael de Heredia) ya se habían reportado perros seropositivos en otros estudios. Un total de 24 cantones resultaron negativos en este estudio, de los cuales cuatro (Aserrí, Santa Ana, Heredia Centro y Alajuela Centro) tenían reportes previos de caninos seropositivos a *T. cruzi* y en 20 cantones nunca se había buscado infecciones de *T. cruzi* en caninos (Cuadro 4 y Figura 3). Actualizando los datos, se han identificado hasta la fecha perros seropositivos en 15 cantones, mientras que en 20 cantones no se han encontrado caninos con tripanosomiasis y en 47 cantones aún no se han realizado estudios serológicos o no se han detectado caninos seropositivos a *T. cruzi* (Cuadro 4 y Figura 3).

Cuadro 4. Cantones con estudios serológicos de *T. cruzi* en caninos de Costa Rica

Provincia	Cantón	En estudios previos	En este estudio
San José	San José	ND	Negativo
San José	Escazú	ND	Negativo
San José	Desamparados	ND	Negativo
San José	Aserri	POSITIVO ^{1,2}	Negativo
San José	Mora	ND	POSITIVO
San José	Santa Ana	POSITIVO ³	Negativo
San José	Alajuelita	ND	Negativo
San José	Vásquez de Coronado	ND	Negativo
San José	Tibás	ND	Negativo
San José	Moravia	ND	Negativo
San José	Montes de Oca	ND	Negativo
San José	Curridabat	ND	Negativo
Heredia	Heredia	POSITIVO ³	Negativo
Heredia	Barva	POSITIVO ^{2,4}	NA
Heredia	Santo Domingo	ND	Negativo
Heredia	San Rafael	POSITIVO ^{2,3,4}	POSITIVO
Heredia	San Isidro	POSITIVO ³	NA
Heredia	Belén	POSITIVO ⁵	NA
Heredia	San Pablo	ND	Negativo
Alajuela	Alajuela	POSITIVO ²	Negativo
Alajuela	Atenas	POSITIVO ²	NA
Alajuela	Poás	POSITIVO ³	NA
Alajuela	San Carlos	ND	Negativo
Cartago	Cartago	ND	Negativo
Cartago	La Unión	ND	Negativo
Cartago	Oreamuno	ND	Negativo
Cartago	El Guarco	ND	Negativo
Guanacaste	Liberia	ND	POSITIVO
Guanacaste	Santa Cruz	POSITIVO ¹	NA
Guanacaste	Cañas	ND	Negativo
Puntarenas	Esparza	POSITIVO ²	NA
Puntarenas	Golfito	ND	POSITIVO
Puntarenas	Garabito	ND	Negativo
Limón	Limón	ND	Negativo
Limón	Pococí	ND	Negativo

ND: no hay dato; NA: no analizado

¹Villegas, 2008; ²Lizundia et al., 2014; ³Montenegro et al., 2002; ⁴Dolz et al., 2015; ⁵Berrocal-Avila et al., 1993

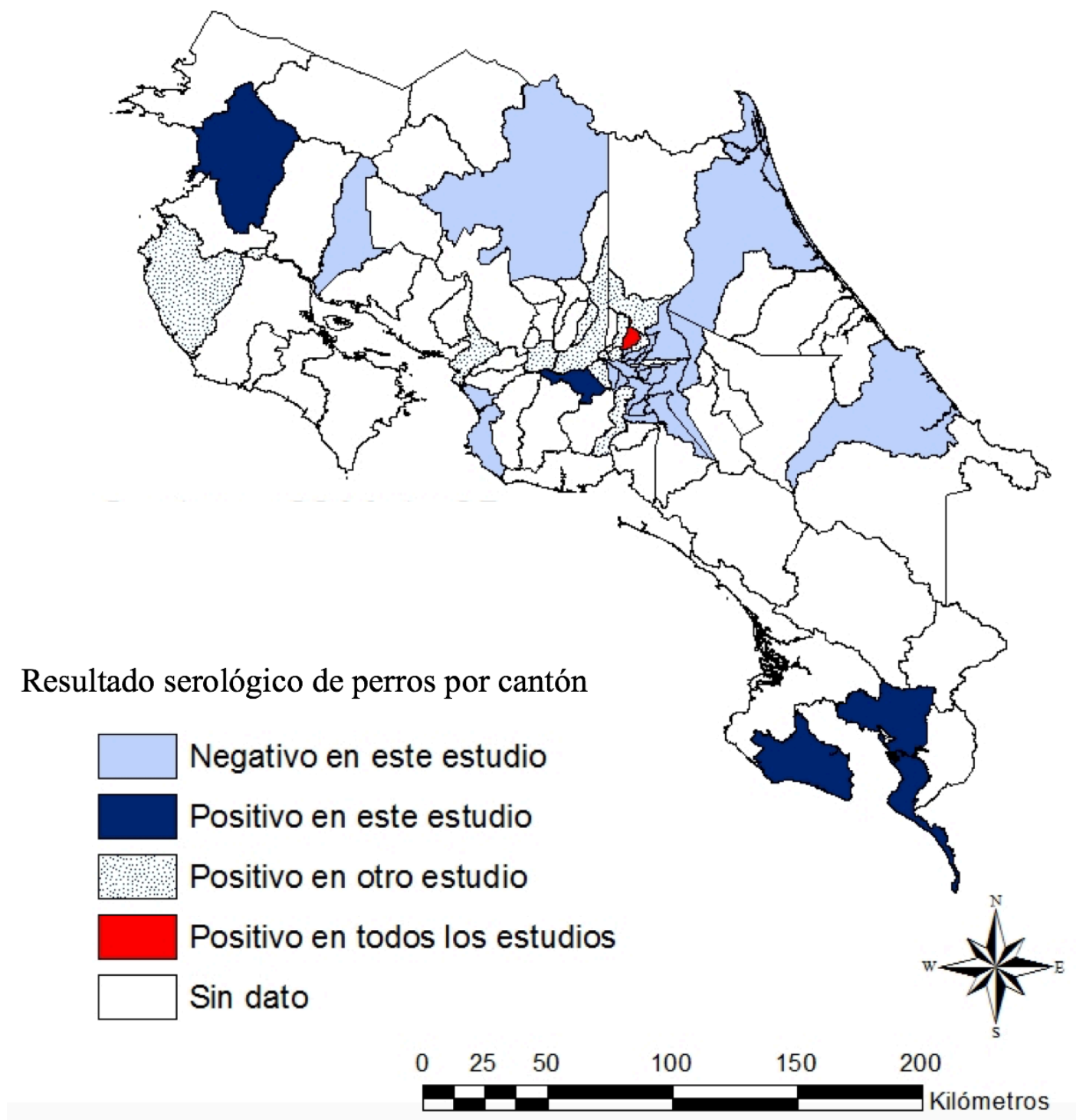


Figura 3. Distribución geográfica de los cantones con estudios serológicos de *T. cruzi* en caninos de Costa Rica

4. Discusión

Este es el primer estudio que analiza la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en caninos de 28 cantones de Costa Rica, reportándose por primera vez la presencia de perros seropositivos en los cantones de Mora, Liberia y Golfito.

Hasta la fecha solamente se han realizado algunos estudios serológicos puntuales y no sistemáticos en caninos en 12 cantones de Costa Rica, donde previamente se habían reportado casos de tripanosomiasis canina. Estos cantones analizados se encontraban en su mayoría en el Valle Central (Berrocal-Avila et al., 1993, Montenegro et al., 2002; Villegas, 2008; Lizundia et al., 2014). El hallazgo de perros seropositivos en tres cantones adicionales, en los que no existían reportes previos de casos de tripanosomiasis canina es importante, ya que brinda información sobre la presencia de *T. cruzi* en caninos en estos cantones, lo que debe de ser comunicado a los veterinarios y a las autoridades de salud pública, para que consideren esta parasitosis como diagnóstico diferencial en cuadros clínicos compatibles.

Actualmente se desconoce la presencia de casos de tripanosomiasis canina en 47 cantones en Costa Rica, aunque en 22 de estos cantones se ha reportado con anterioridad la presencia de *T. dimidiata* (Zeledón, 1981; Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), 2017). En total, se ha reportado la presencia del vector en 50 (61%) del total de 82 cantones del país, por lo que se considera que está distribuido en la mayor parte del territorio de Costa Rica.

La detección de anticuerpos contra *T. cruzi* en los perros, indican tanto exposición al agente como también infección de los caninos con el parásito (Tenney et al., 2014). Para el diagnóstico de infecciones de *T. cruzi* se recomienda utilizar pruebas serológicas, ya que existe mayor probabilidad de detectar los anticuerpos que el parásito, debido a que los anticuerpos se producirán durante toda la vida de los caninos y se detectarán en las muestras de sangre, puesto que para animales no hay disponible tratamiento que elimine la infección (Tenney et al., 2014).

La parasitemia fluctúa durante la infección en los caninos, aunque generalmente ocurre en bajas cantidades, especialmente en la fase crónica, lo cual hace difícil el diagnóstico de animales infectados. El diagnóstico del parásito en sangre se realiza mediante técnicas directas como la microscopia de luz, métodos de cultivo y pruebas moleculares, como también por medio del xenodiagnóstico (Eloy & Lucheis, 2009).

Aunque *T. dimidiata* es el principal vector de la tripanosomiasis americana en Costa Rica, y tiene una alta predilección por sangre canina para su alimentación, parecen infectarse un bajo número de triatomíneos al alimentarse con sangre canina, ya que se demostró que los caninos tienen una más baja infectividad (11.3%) que animales silvestres como los didélfidos, en los cuales se encontró una infectividad del 44% (Calderón-Arguedas et al., 2001). En un estudio realizado en Costa Rica en el 2002, solamente un 5.5% de los perros analizados se diagnosticaron como positivos a *T. cruzi* mediante xenodiagnóstico, mientras que un 27.7% de estos caninos mostraron anticuerpos contra el parásito (Montenegro et al., 2002). Según estos estudios la mayoría de perros seropositivos representan un riesgo bajo de infección para los triatomíneos. A pesar de esto, es importante determinar los cantones con caninos infectados con el parásito, ya que estos animales representan una fuente de infección para los vectores, existiendo la posibilidad de infección de otros caninos y hasta de seres humanos.

La razón por la cual no se detectó signos clínicos compatibles con la tripanosomiasis en los caninos seropositivos, probablemente se debe a que éstos se encontraban en la fase intermedia de la enfermedad, la cual se ha reportado que ocurre de manera asintomática, donde los parásitos se replican en las células musculares, y al no haber gran daño no se evidencia la sintomatología cardíaca. En el transcurso de la infección, los individuos manifestarán con mayor grado la sintomatología clínica (Tenney et al., 2014; Meyers et al., 2017).

En esta investigación, dos caninos mostraron mucosas pálidas o muy pálidas, en éstos se encontraron garrapatas el día de la revisión clínica, lo cual pudo haber sido la razón del hallazgo clínico o debido a alguna otra infección concomitante producida por algún hemoparásito transmitido por garrapatas (Barrantes-González et al., 2016b).

Los animales detectados como seropositivos en el presente trabajo fueron sobre todo animales jóvenes, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura, que las infecciones por *T. cruzi* se dan sobre todo en perros jóvenes, ya sea, porque los cachorros fueron infectados transplacentariamente, o bien, porque ingirieron los triatominos por accidente al jugar con ellos (Greene, 2012; Berrizbeitia et al., 2013; Rodrigues, 2015). También, la fase aguda de la enfermedad parece ocurrir generalmente en animales jóvenes, los cuales presentarán altos títulos de anticuerpos debido a la infección reciente, lo cual concuerda con lo encontrado en el presente trabajo (De Lana et al., 1992; Greene, 2012).

Una limitante del estudio, fue el no contar con la información sobre la presencia del vector en la vivienda de los caninos, así como otros datos tales como el tipo de construcción de la vivienda, la cercanía de la vivienda a cafetales o lotes baldíos, y la presencia de materiales acumulados en el área intra o peridomiciliar, entre otros, que se consideran como factores de riesgo de la tripanosomiasis (Norma de atención integral de la enfermedad de Chagas, 2012). Esta información hubiera sido útil para relacionar las infecciones en los caninos con estos factores de riesgo. Sin embargo, es importante resaltar, que en tres de los cantones, en los cuales se reportaron por primera vez caninos seropositivos, se había reportado previamente la presencia del vector (Mora, San Rafael y Liberia) (Zeledón, 1981; Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), 2017).

Golfito es el único cantón de Costa Rica, en el que hasta el momento no se habían reportado vectores triatomíneos, pero se determinó un canino seropositivo. Esto puede deberse, ya sea, que el vector está presente en el cantón, pero que no se ha investigado y encontrado hasta la fecha; o que el canino se haya infectado en otra zona, y luego llegara a residir al cantón de Golfito. Esto no pudo ser investigado, ya que el día de la toma de muestra los propietarios no indicaron cuánto tiempo llevaba el canino conviviendo con ellos en Golfito. Sin embargo, los propietarios reportaron que el perro vivía la mayor parte del tiempo afuera y en los alrededores de la casa, por lo que, en caso de encontrarse el vector en la zona, habría tenido la oportunidad de ingerirlo accidentalmente (Greene, 2012; Berrizbeitia et al., 2013; Rodrigues, 2015).

En el cantón de San Rafael de Heredia, se conoce la presencia de vectores triatomíneos infectados con el parásito *T. cruzi* desde 1952 (Berrocal-Avila et al., 1993). En 1993 se reportó el primer caso de tripanosomiasis aguda en un cachorro de 9 meses, el cual murió súbitamente, y en la necropsia se encontraron alteraciones cardíacas, confirmando *T. cruzi* como la causa de muerte. Además, en la vivienda del cachorro se encontraron vectores positivos (Berrocal-Avila et al., 1993). Otros tres estudios serológicos, también encontraron caninos positivos en este cantón (Montenegro et al., 2002; Lizundia et al., 2014; Dolz et al., 2015), lo que sugiere que este cantón reúne las condiciones que favorecen el establecimiento de la enfermedad.

La enfermedad de Chagas ha sido muy poco estudiada en Costa Rica, tanto en humanos como en caninos. Es hasta en el año 2003, que la enfermedad de Chagas se declara como un problema prioritario de salud pública y se inicia con el tamizaje del 100% de las donaciones sanguíneas (Norma de atención integral de la enfermedad de Chagas, 2012; Campos-Fuentes & Calvo-Fonseca, 2013). En el 2005, la OMS declaró la enfermedad de Chagas como una enfermedad tropical desatendida, esto con el fin de implementar medidas de control.

Las infecciones por *T. cruzi* en humanos son de reporte obligatorio en Costa Rica y la vigilancia epidemiológica de los casos se realiza en forma pasiva (Norma de atención integral de la enfermedad de Chagas, 2012). En contraste, la enfermedad de Chagas no es de reporte obligatorio en animales ni tampoco existen programas para su vigilancia epidemiológica en nuestro país (Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), 2008).

Por ser ésta una enfermedad zoonótica, y los perros los principales hospedadores domésticos de la enfermedad, que además son infectados en condiciones naturales más frecuentemente que los humanos, se recomienda utilizar los caninos como centinelas para estimar las infecciones en humanos (Barbabosa-Pliego et al., 2011; Castillo-Neyra et al., 2015).

Los resultados generados en este estudio, amplían la información sobre la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en caninos de Costa Rica y presentan la situación actual de la tripanosomiasis canina en el país. Se recomienda realizar más investigaciones en caninos, sobre todo sistemáticas y de amplia cobertura en Costa Rica, para poder determinar las zonas o cantones endémicos de la enfermedad de Chagas.

5. Conclusiones

Se estableció la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en cinco de 427 caninos provenientes de cuatro cantones distintos (Mora, San Rafael de Heredia, Liberia y Golfito).

Se determinó una seroprevalencia de 1.17% de tripanosomiasis canina en Costa Rica.

Se reportó por primera vez la presencia de caninos seropositivos a *T. cruzi* en tres cantones (Mora, Liberia y Golfito), en los cuales no se había reportado aún la presencia del parásito en perros.

6. Recomendaciones

Informar a la comunidad de médicos veterinarios sobre los resultados obtenidos, para que se tome en cuenta la enfermedad de Chagas como un diagnóstico diferencial, en perros que viven en zonas donde se han reportado casos de tripanosomiasis canina.

Realizar estudios sistemáticos y de amplia cobertura en Costa Rica, no sólo en los cantones donde se han dado reportes previos de casos de tripanosomiasis canina, para poder determinar las zonas o cantones endémicos que representan un foco de infección para otras localidades.

7. Referencias bibliográficas

- Arce-Fonseca, M., Carrillo-Sánchez, S.C., Molina-Barrios, R.M., Martínez-Cruz, M., Cedillo-Cobián, J.R., Henao-Díaz, Y.A. & Rodríguez-Morales, O. (2017). Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in domestic dogs from Sonora, Mexico. *Infectious diseases of poverty*. 6(1), 120.
- Barbabosa-Pliego, A., Campos, P., Olivares, D., Aparicio-Burgos, J.E., Montes de Oca-Jiménez, R., Martínez-Castañeda, J.S., Ochoa-García, L., Guzmán-Bracho, C., Estrada Franco, J.G, Garg, N.J. & Vazquez, J.C. (2011). Prevalence of *Trypanosoma cruzi* in dogs (*Canis familiaris*) and triatomines during 2008 in a sanitary region of the State of Mexico, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 11(2), 151-156.
- Barrantes-González, AV., Jiménez-Rocha, A.E., Romero-Zuñiga, J.J. & Dolz, G. (2016a). Serology, molecular detection and risk factors of *Ehrlichia canis* infection in dogs in Costa Rica. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 7(6), 1245-1251.
- Barrantes-González, A.V., Jiménez-Rocha, A.E., Romero-Zuñiga, J.J. & Dolz, G. (2016b). Understanding *Ehrlichia canis* Infections in Dogs of Costa Rica: Hematological Findings and Indicative Clinical Signs. *Medicine*. 6, 163-175.
- Berrizbeitia, M., Concepción, J.L., Carzola, V., Rodríguez, J., Cáceres, A. & Quiñones, W. (2013). Seroprevalence of *T. cruzi* infection in *Canis familiaris*, state of Sucre, Venezuela. *Biomédica*. 33(2), 214-225.
- Berrocal-Avila, A., Morales-Acuña, J.A., Cordero, V. & Villalobos, C. (1993). Miocarditis aguda chagásica en caninos de Costa Rica. Acute myocarditis due to *Trypanosoma cruzi* in dogs in Costa Rica. *Revista de Ciencias Veterinarias (Heredia)*. 15(1), 51-59.

- Calderón-Arguedas, O., Chinchilla, M., García, F. & Vargas, M. (2001). Preferencias alimentarias de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) procedente de la meseta central de Costa Rica a finales del siglo XX. *Parasitología al día*. 25(3-4), 78-81.
- Campos- Fuentes, E. & Calvo-Fonseca, N. (2013). Confirmación diagnóstica del tamizaje de enfermedad de Chagas en Costa Rica. *Rev Costarr Pública*. 22, 4-8.
- Castillo-Neyra, R., Chou Chu, L., Quispe-Machaca, V., Ancca-Juarez, J., Chavez Malaga, F.S., Bastos Mazuelos, M., Naquira, C., Bern, C., Gilman, R.H. & Levy, M.Z. (2015). The potential of canine sentinels for reemerging *Trypanosoma cruzi* transmission. *Prev. Vet. Med.* 120(3), 349-356.
- De Lana, M., Chiari, E. & Tafuri, W.L. (1992). Experimental Chagas' disease in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 87(1), 59-71.
- Dias-Perez, T., Borges-Figueiredo, F., Mendes, A.A., Laurentino-Silva, V., Madeira, M.D.F., Pecanha-Brazil, R. & Rodrigues-Coura, J. (2016). Prevalence of American trypanosomiasis and leishmaniasis in domestic dogs in a rural area of the municipality of São João do Piauí, Piauí state, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 58(79), 1-6.
- Dolz, G., Urbina, A., Herrero, M., Mendoza, N., Argüello, M. y Madrigal, V. (2015). Distribución del *Trypanosoma cruzi* usando como indicadores su presencia en perros y en vectores. San José, C.R. Colegio de Periodistas de Costa Rica. Oct. 10.
- Eloy, L.J. & Lucheis, S.B. (2009). Canine trypanosomiasis: etiology of infection and implications for public health. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 15(4), 589-611.
- Galvao, C & Justi, S.A. (2015). An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Trop.* 151, 116-125.

Greene, C. (2012). Infectious diseases of the dog and cat. 4 ed. United States, Elsevier.

Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio). (2017). Base de datos de especímenes (Atta), Ficha de especies. [en línea]: *Triatoma dimidiata*, Especímenes y observaciones. <http://www.crbio.cr:8080/neoportal-web/?q=triatoma%20dimidiata> (Consulta: 01 may. 2017).

Lizundia, R., Picado, A., Cordero, M., Calderon, A., Deborggraeve, S., Montenegro, V. M. & Urbina, A. (2014). Molecular and serological rapid tests as markers of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs in Costa Rica. *Tropical Parasitology*. 4(2), 111.

Matamoras, X. (2002). Caracterización por Biodemas y Zimodemas de cepas de *Trypanosoma cruzi*, circulantes en zonas endémicas de las Repúblicas de Nicaragua y Costa Rica. Tesis de maestría en Enfermedades Tropicales, para optar por el título de Magister Scientiae. Universidad Nacional. Costa Rica.

Meyers, A.C., Meinders, M. & Hamer, S.A. (2017). Widespread *Trypanosoma cruzi* infection in government working dogs along the Texas-Mexico border: Discordant serology, parasite genotyping and associated vectors. *PLoS neglected tropical diseases*. 11(8), e0005819.

Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). (2008). Listado de enfermedades animales de declaración obligatoria. Decreto No 34669-MAG. Presidencia de la República y Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica.

Ministerio de Salud (2015). Memoria Institucional 2014. San José, Costa Rica, El Ministerio.

Montenegro, V.M., Jimenez, M., Dias, J.C. & Zeledon, R. (2002). Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97, 491-494.

- Norma de atención integral de la Enfermedad de Chagas. (2012). Decreto Ejecutivo N° 37269-S. Presidencia de la República y Ministerio de Salud. Gobierno de Costa Rica.
- Nieto, P.D., Boughton, R., Dorn, P.L., Steurer, F., Raychaudhuri, S., Esfandiari, J., Gonçalves, E., Diaz, J. & Malone, J.B. (2009). Comparison of two immunochromatographic assays and the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs in south central Louisiana. *Veterinary parasitology*. 165(3), 241-247.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Nota descriptiva. [en línea]: La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> (Consulta: 20 ene. 2018).
- Pérez, F., Vargas, L.G., Fernández, O. & Velásquez, R. (1984). Enfermedad de Chagas Aguda: reporte de tres casos tratados con Nifurtimox®. *Acta Med. Costarric.* 27, 94-101.
- Rodrigues, J. (2015). The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions – A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 110(3), 277-282.
- Saldaña, A., Calzada, J.E., Pineda, V., Perea, M., Rigg, C., González, K., Santamaria, A.M., Gottdenker, N.L. & Chaves, L.F. (2015). Risk factors associated with *Trypanosoma cruzi* exposure in domestic dogs from a rural community in Panama. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 110(7), 936-944.
- Tenney, T.D., Curtis-Robles, R., Snowden, K.F. & Hamer, S.A. (2014). Shelter dogs as sentinels for *Trypanosoma cruzi* transmission across Texas. *Emerging infectious diseases.* 20(8), 1323.

Villegas, A. (2008). Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en perros de dos zonas rurales con altos y bajos índices de infestación por *Triatoma dimidiata*. Tesis para optar por el grado académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional. Costa Rica.

Zeledón, R. (1981). El *Triatoma dimidiata* y su relación con la enfermedad de Chagas. Editorial Universidad Estatal a distancia. San José. Costa Rica.

ARTÍCULO II

Tripanosomiasis canina en la comunidad de Getsemaní: demostración del ciclo activo de infección

Resumen

La enfermedad de Chagas es una enfermedad zoonótica producida por el protozoario *Trypanosoma cruzi*. En Costa Rica se han realizado pocos estudios en perros, pero ninguno que investigue la infección de *T. cruzi* en perros de áreas endémicas a través del tiempo mediante diagnóstico serológico y molecular, e identificando el linaje de evolución de *T. cruzi* infectando a los perros y a los triatominos. El presente estudio se realizó en la comunidad de Getsemaní, Heredia, en donde se analizaron muestras de sangre de 55 caninos negativos a *T. cruzi* al inicio del estudio, en intervalos de tres a cuatro meses, mediante microscopía de luz, hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los caninos se dividieron en dos grupos: Grupo 1, el cual lo conformaron 25 perros viviendo en hogares, en donde se había determinado previamente la presencia del vector en el domicilio o peridomicilio; y Grupo 2, el cual lo conformaron 30 perros viviendo en hogares en los que no se habían hallado vectores en el domicilio o peridomicilio. En total seis caninos (10.9%), todos pertenecientes al Grupo 1, seroconvirtieron durante el estudio en los primeros meses del año (época seca), manteniéndose seropositivos hasta el final de la investigación. Se determinó una incidencia de 24% de tripanosomiasis canina en el Grupo 1. Sólo uno de los seis caninos seropositivos, resultó también positivo, una única vez, en la PCR de *T. cruzi*. El análisis de la secuencia de esta muestra, como las secuencias de *T. cruzi* amplificadas de los triatominos encontrados en las casas de los perros del Grupo 1, determinó a todas pertenecientes al linaje TcI. Se concluye que el ciclo de infección de *T. cruzi* se mantiene aún activo en la comunidad de Getsemaní, sobre todo en caninos que habitan en viviendas con reportes del vector en ellas. Se recomienda concientizar a los pobladores sobre la eliminación de los vectores en sus domicilios y peridomicilios.

Palabras claves

Trypanosoma cruzi, unidades discretas de tipificación (DTU), anticuerpos, hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Secuenciación, Costa Rica.

Abstract

Chagas disease is a zoonotic infection produced by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. In Costa Rica, few studies have been conducted in dogs, but none studied the infection of *T. cruzi* in dogs from endemic areas over time, by serological and molecular techniques, and identifying the lineage of evolution of *T. cruzi* infecting the dogs and the triatomines. The present study was conducted in the community of Getsemaní, Heredia. Blood samples from 55 negative canines to *T. cruzi* at the beginning of the study were analyzed, at intervals of three to four months, by light microscopy, indirect hemagglutination (IHA), indirect immunofluorescence (IFA) and polymerase chain reaction (PCR). The canines were divided into two groups: Group 1, which consisted of 25 dogs living in homes, where the presence of the vector was previously determined in the home or surroundings; and Group 2, which consisted of 30 dogs living in households in which no vectors were found in the home or surroundings. In total, six dogs (10.9%), all belonging to Group 1, seroconverted during the study in the first months of the year (dry season), remaining seropositive until the end of the investigation. A 24% incidence of canine trypanosomiasis was determined in Group 1. Only one of the six seropositive canines, was also positive by PCR for *T. cruzi*. The analysis of the sequence of this sample, and the sequences of the triatomines found in the houses of the dogs of Group 1, were determined as *T. cruzi* lineage TcI. It is concluded that the infection cycle of *T. cruzi* is still active in the community of Getsemaní, especially in canines living in homes with reports of the vector in them. It is recommended to alert and mention the residents to eliminate the vectors in their homes and surroundings.

Keywords

Trypanosoma cruzi, discrete typing units (DTU), antibodies, indirect hemagglutination (HAI), indirect immunofluorescence (IFA), polymerase chain reaction (PCR), Sequencing, Costa Rica.

1. Introducción

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad zoonótica producida por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, el cual puede infectar a humanos, animales domésticos y silvestres (Galvao & Justi, 2015).

Este parásito es transmitido por vectores triatomínicos que pertenecen al orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae. Son insectos hematófagos, principalmente nocturnos, que se alimentan de la sangre de humanos, animales silvestres y domésticos (Zeledón et al., 2016).

La enfermedad de Chagas se encuentra distribuida principalmente en América Latina, donde se considera una enfermedad endémica. En países endémicos se recomienda evaluar rutinariamente a los perros, ya que se consideran uno de los principales hospedadores domésticos, y en condiciones naturales, éstos son infectados con mayor frecuencia que los humanos, por lo que pueden ser utilizados como centinelas para estimar las infecciones en humanos (Abad-Franch et al., 2010; Barbabosa-Pliego et al., 2011; Greene, 2012; Castillo-Neyra et al., 2015).

La enfermedad de Chagas ha sido muy poco estudiada en Costa Rica, tanto en humanos como en caninos. Hasta el 2002 no se había considerado como un problema prioritario de salud pública en el país. Hoy en día, la enfermedad de Chagas es de reporte obligatorio en humanos y la vigilancia epidemiológica se realiza en forma pasiva (Norma de atención integral de la enfermedad de Chagas, 2012). Sin embargo, no es una enfermedad de reporte obligatorio en animales, ni tampoco existen programas de vigilancia epidemiológica en caninos en Costa Rica (Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), 2008).

La tripanosomiasis canina en Costa Rica, se reportó por primera vez en 1952, en un canino en San Rafael de Heredia, donde se encontró el parásito mediante un frotis de sangre. El canino convivía con una familia, que también se encontró infectada con el parásito. En 1993 se reportó otro caso de tripanosomiasis aguda en San Rafael de Heredia, en un cachorro de 9 meses, el cual murió súbitamente. En la necropsia e histopatología, se encontró lesiones cardíacas ocasionadas por *T. cruzi*, por lo que se determinó ésto como la causa de muerte. Además, en la vivienda de este cachorro se encontraron vectores positivos (Berrocal-Avila et al., 1993). Desde entonces, se han realizado tres estudios serológicos en San Rafael de Heredia, y en todos se han encontrado caninos positivos (Montenegro et al., 2002; Lizundia et al., 2014; Dolz et al., 2015).

El estudio más amplio se realizó en el 2015, en 177 viviendas de la comunidad de Getsemaní (cantones de Barva y San Rafael de Heredia), encontrándose 21 (11.9%) casas con chinches. En 14 (66%) de estas casas se encontraron también nidos de los triatominos, intra o peridomiciliar, demostrándose el establecimiento del vector en las viviendas, lo cual representa un riesgo de infección para los humanos y animales domésticos. Además, en el 55% de los chinches recolectados en estas viviendas, se detectó el parásito. También se revisaron los 289 perros que vivían en las 177 viviendas, y se encontraron 22 (7.6%) con anticuerpos contra *T. cruzi* (positivos para la prueba de hemaglutinación indirecta, HAI) y 16 (5.5%) perros con ADN de *T. cruzi* en la sangre (positivos mediante la reacción en cadena de la polimerasa, PCR) (Dolz et al., 2015).

Para la detección de infecciones por *T. cruzi* en caninos se recomienda utilizar pruebas de diagnóstico indirectas o serológicas como la HAI, el inmunoensayo enzimático (ELISA) o la inmunofluorescencia indirecta (IFI), ya que una vez infectados los perros con el parásito, desarrollarán en los primeros 7 a 15 días post infección anticuerpos, que podrán ser detectados durante toda la vida o durante el tiempo de infección (Tenney et al., 2014). Sin embargo, se recomienda utilizar al menos dos técnicas serológicas para confirmar un resultado positivo (Ribeiro et al., 2012; Bautista-López et al., 2016).

También se pueden utilizar pruebas directas para detectar el parásito, entre éstas, la técnica molecular PCR, la cual es la más utilizada por poseer una alta especificidad y sensibilidad (Telleria & Tibayrenc, 2010; Tanowitz & Weiss, 2017). Para el diagnóstico de *T. cruzi* se han utilizado diferentes protocolos de PCR, que amplifican varias regiones de sus genes, debido a su gran diversidad genética. Se ha determinado que la PCR que amplifica la región hipervariable del cinetoplasto (kDNA) detecta de manera certera la presencia de *T. cruzi* en las muestras de triatomíneos y sangre de mamíferos (Pinto et al., 2015). Asimismo, para confirmar los resultados mediante PCR, se recomienda amplificar un segmento del gen 18S rRNA, ya que es un gen más conservado, que permite además establecer la especie y el linaje del tripanosoma infectante y el producto amplificado se visualiza de mejor manera (Pinto et al., 2015; Aleman et al., 2017).

Hasta el momento se han descrito siete linajes de evolución de *T. cruzi*, denominados como Unidades Discretas de Tipificación (DTU, por su nombre en inglés Discrete Typing Units): TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y TcBat. (Muñoz-San Martín et al., 2017).

En Costa Rica se han realizado muy pocos estudios sobre la tripanosomiasis canina. Además, no se han realizado estudios que investiguen la infección de *T. cruzi* en perros de áreas endémicas a través del tiempo, mediante diagnóstico serológico y molecular. Tampoco se han caracterizado los linajes de evolución de *T. cruzi* que se encuentran infectando a los perros en áreas endémicas. Por lo tanto, este estudio se realizó en la comunidad de Getsemaní, una comunidad en la que se han detectado varias veces caninos infectados con *T. cruzi*. Además, se pretendió determinar por primera vez en la comunidad, la aparición de nuevos casos de infección de *T. cruzi* en caninos durante un año, para así conocer si el ciclo del parásito se encuentra aún activo en dicha comunidad y caracterizar los linajes de evolución presentes en este poblado.

2. Metodología

2.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio longitudinal, observacional y descriptivo en caninos negativos a *T. cruzi* de la comunidad de Getsemaní, para demostrar que el ciclo de infección de la tripanosomiasis canina se encuentra activo en esta comunidad.

2.2 Descripción del área de estudio

El estudio se realizó en la comunidad de Getsemaní, un poblado que pertenece a los distritos de Santa Lucía del cantón de Barva y el distrito de Los Ángeles del cantón de San Rafael de Heredia (Figura 1). La comunidad se ubica en una zona periurbana al norte de la ciudad de Heredia. Se encuentra a una altura aproximada de 1240 - 1500 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura promedio de 20.1°C. La precipitación anual es de aproximadamente 2.374 mm y la estación seca es de diciembre a abril. Es una zona rocosa debido a la cercanía al volcán Barva. Las principales actividades en la zona son la agricultura, principalmente cultivos de café y producción animal (bovinos y suinos), por lo que tiene grandes extensiones de potreros y bosques (Moreno et al., 1998; Sandoval, 2011; Sandoval & Barrantes, 2012). Basado en el hallazgo de vectores, reportes de casos en humanos y animales, se seleccionó esta comunidad, ya que se considera endémica para la enfermedad de Chagas (Dolz et al., 2015; Lizundia et al., 2014).

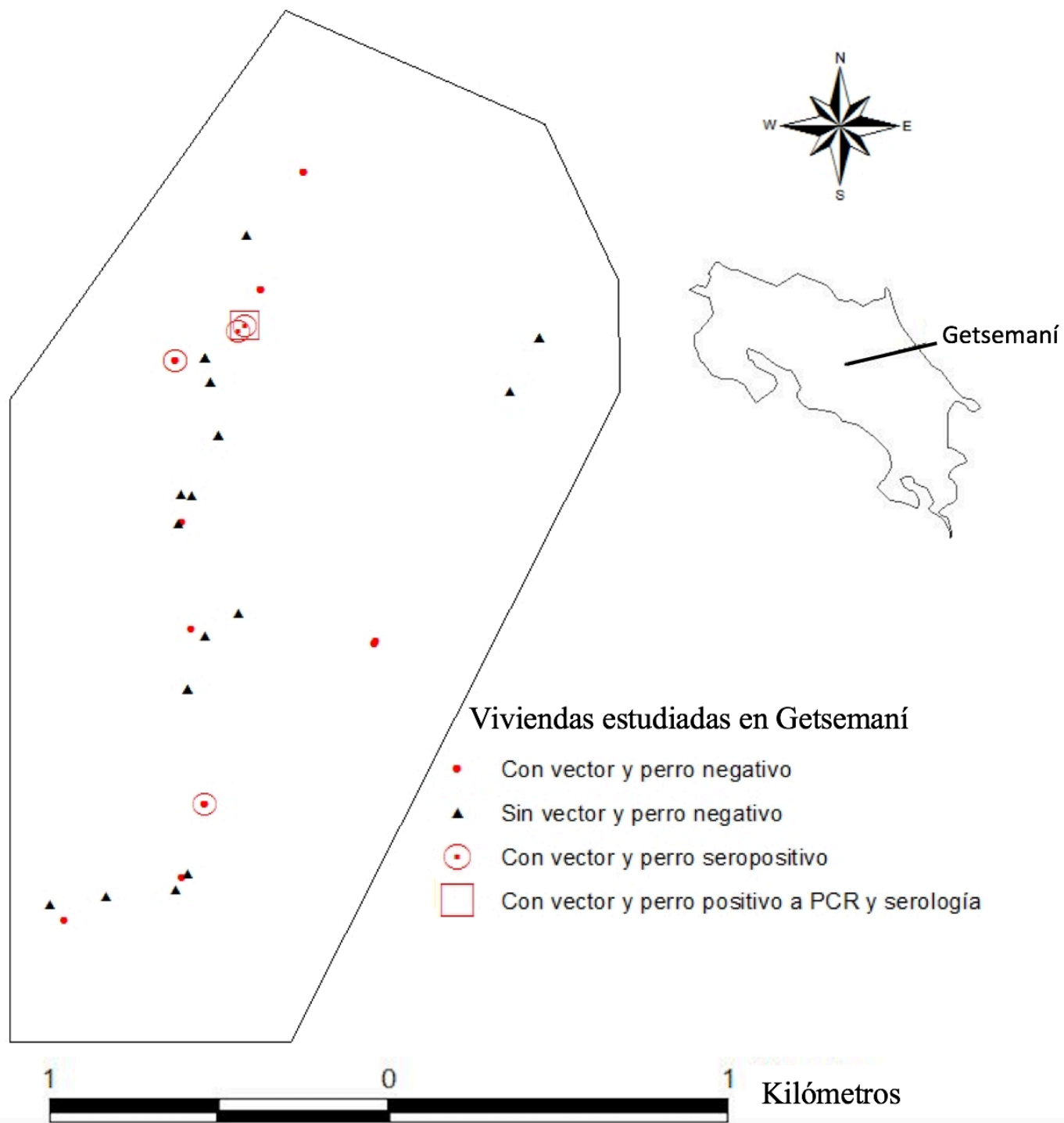


Figura 1. Distribución de las viviendas en estudio de la comunidad de Getsemaní, según la presencia de vectores y resultados de los caninos positivos

2.3 Tipo y tamaño de la muestra

Se recolectó sangre de 55 caninos que resultaron negativos para *T. cruzi* al principio del estudio (setiembre, 2015), y que vivían en 28 casas. Se examinaron cuatro veces, durante un año, en intervalos de aproximadamente cuatro meses cada uno (enero, mayo, setiembre y diciembre 2016). La muestra se dividió en dos grupos, el Grupo 1, que consistió de un grupo de 25 perros negativos a *T. cruzi*, que vivían en 12 hogares en donde se había determinado previamente la presencia del vector en el domicilio o peridomicilio (Dolz et al., 2015), y el Grupo 2, que consistió en un grupo de 30 perros, también negativos a *T. cruzi*, que vivían en 16 casas sin hallazgos o reportes previos del vector en el domicilio o peridomicilio, pero que vivían cerca de los caninos del Grupo 1 (Figura 1).

2.4 Recolección de datos

Se contó con el consentimiento informado de los propietarios de las viviendas (Anexo 2), para realizar el estudio con sus perros. Se les contactó por teléfono una semana antes, para coordinar las visitas para la toma de muestras y revisión de los caninos. También, se contó con la autorización de la Comisión de Bienestar Animal y Bioética de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica (Nº 03-2014).

En cada visita se llenó una ficha clínica con la información del propietario (nombre, dirección, coordenadas geográficas y el código de la casa previamente asignado), la información del canino (nombre, raza, edad, sexo, si se encontraba esterilizado y el código previamente asignado), así como los resultados de la revisión clínica (frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, sonidos cardíacos, temperatura, pelaje, piel, tiempo de llenado capilar, hidratación, membranas mucosas, linfonodos, condición corporal, secreciones nasales, secreciones oculares, presencia de ectoparásitos y actitud), para poder evaluar posibles cambios en los caninos (Anexo 3).

El Grupo 1 (perros que vivían en viviendas con vectores de *T. cruzi*) lo conformaron 12 hembras y 13 machos, tres perros con edades entre 0-1 año (cachorros), 21 entre los 2-7 años (adultos) y un canino entre los 8-15 años (geriátrico). Diecinueve caninos eran sin raza definida (SRD) y seis poseían alguna raza (1 American Staffordshire Terrier, 1 Cocker Spaniel, 2 Caniche y 2 Schnauzer miniatura).

El Grupo 2 (perros que vivían en viviendas sin vectores de *T. cruzi*) lo conformaron 14 hembras y 16 machos, 8 que se encontraban entre 0-1 año de edad, 18 entre los 2-7 años y cuatro caninos entre los 8-15 años. Además, 17 caninos fueron sin raza definida y 13 poseían alguna raza (1 American Staffordshire Terrier, 1 Bulldog Inglés, 1 Chihuahua, 3 Caniche, 1 Golden Retriever, 2 Husky Siberiano, 2 Labrador Retriever y 2 Pomerania).

2.5 Toma de la muestra de sangre

Las muestras de sangre se tomaron con la adecuada sujeción y desinfección del canino, siempre bajo la supervisión de un médico veterinario. Las muestras se tomaron de la vena cefálica o vena safena, aproximadamente 4 ml, colocando 1 ml en tubos sin anticoagulante y 3 ml en tubos con anticoagulante EDTA (sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético). Todos los tubos se rotularon con el código asignado previamente al canino y se transportaron a 4°C en una hielera, hasta el Laboratorio de Entomología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, en donde se separó el suero mediante centrifugación (2000 g por 10 min), se rotuló, y se congeló a -20°C. Las muestras de sangre con EDTA se analizaron en el microscopio de luz y posteriormente se congelaron a -20°C hasta su posterior procesamiento.

2.6 Observación microscópica

Las muestras de sangre con EDTA, tomadas de los caninos en Getsemaní, fueron evaluadas en el microscopio de luz antes de ser congeladas a -20°C para su posterior análisis mediante PCR. Para esto, las muestras se centrifugaron a 2000 g por 10 minutos, para tomar una gota de la capa leucocitaria, la cual se colocó en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se observó en el microscopio de luz a 10x, 20x y 40x para establecer la presencia de tripomastigotos en cada muestra.

2.7 Análisis serológico

Los sueros de los 55 caninos recolectados durante el año 2016 se analizaron mediante las pruebas de HAI e IFI. Para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* mediante HAI se utilizó el kit comercial “Chagatest HAI” de Laboratorios Wiener (Rosario, Argentina). La HAI se realizó según el protocolo recomendado por los fabricantes. Las muestras que resultaron con títulos de anticuerpos en la dilución 1:16 fueron consideradas positivas. Estos sueros se sometieron de nuevo a la HAI con diluciones seriadas (1:16 hasta 1:4096) para determinar el título final.

Para la IFI se prepararon las láminas en el Laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. Para esto, se tomó un cultivo de epimastigotos de *T. cruzi* en fase exponencial de crecimiento en medio líquido de LIT (Infusión de hígado y triptona). Se colocó 25 µl en cada uno de los pocillos de las láminas de IFI, en dilución 1.3×10^6 de parásitos por ml en solución de Locke. Se dejó secar las láminas en la estufa a 37°C durante 15 minutos, se fijaron con acetona pura por 2 minutos y se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

Para realizar la IFI, se diluyeron los sueros 1:32 en PBS y se colocaron 25 µl en forma individual en los pocillos de las láminas. Como controles, se utilizaron sueros caninos previamente identificados en el Laboratorio de Zoonosis como negativos o positivos. En cada lámina se utilizó un pocillo para cada control. Se incubó las láminas por 30 minutos a 37°C en una cámara húmeda, seguidamente se lavó 2 veces con PBS por 10 minutos, y se agregó el conjugado (anti IgG perro con fluoresceína; 0855325, MP Biomedicals®). Se volvió a incubar por 30 minutos a 37°C en la cámara húmeda, se realizaron otros 2 lavados con PBS y se observó las láminas en microscopio de inmunofluorescencia. Los sueros que mostraron fluorescencia en la dilución 1:32 se consideraron positivos. Los sueros positivos se sometieron nuevamente a la IFI (diluciones 1:32 hasta 1:4096) para determinar el título final.

2.8 Análisis molecular

La extracción del ADN de las muestras de sangre de caninos se realizó utilizando el kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen®), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Posteriormente, el ADN se utilizó para amplificar un segmento de aproximadamente 667 pb del gen 18S rRNA, por medio de una PCR anidada (Pinto et al., 2015; Aleman et al., 2017). Los iniciadores que se utilizaron en la primera ronda fueron SSU4_F (5'-TGCCAGCACCCGCGGTAAT-3') y 18Sq1R (5'-CCACCGACCAAAAGCGGCCA-3') (Pinto et al., 2015). Los iniciadores de la segunda ronda fueron SSU561F (5'-TGGGATAACAAAGGAGCA-3') y SSU561R (5'-CTGAGACTGTAACCTCAAAGC-3') (Noyes et al., 1999).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl, agregando 1 µl de ADN de la muestra, 12.5 µl DreamTaq™ PCR Master Mix 2X (ThermoScientific, USA), 0.5 µl de cada uno del par de iniciadores en cada ronda (16 µM) y 11 µl de agua libre de nucleasas (ThermoScientific, USA) (Noyes et al., 1999). Como control positivo se utilizó una muestra de sangre canina previamente confirmada mediante secuenciación como positiva para *T. cruzi* y que será depositada en la base de datos del Centro Nacional de Información para Biotecnología (NCBI); como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas (ThermoScientific, USA). El protocolo del PCR anidado consistió en un protocolo “gradiente hacia abajo”, el cual se utilizó en ambas rondas y se describe en el Cuadro 1 (Murphy & O'Brien, 2007; Aleman et al., 2017).

La electroforesis de todos los productos de la segunda ronda se realizó en geles de agarosa al 1% (Noyes et al., 1999), utilizando GelRed para la tinción del ADN, y se corrieron en una cámara de electroforesis a 100 voltios de 30 a 40 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó GenRuler 100 pb DNA Ladder Plus (Fermentas®). Las bandas que mostraron un peso molecular de aproximadamente 667 pb (Aleman et al., 2017) fueron consideradas como positivas para *T. cruzi* y se enviaron a purificar y secuenciar a Macrogen Inc. (Seoul, Corea del Sur).

También, se analizaron mediante la PCR anidada y se enviaron a purificar y a secuenciar a Macrogen Inc, cinco extracciones de ADN del estudio en el 2015 en la comunidad de Getsemaní, cuatro de ellas muestras de chinches, los cuales pertenecían a las casas 4, 5, 7 y 22 del Grupo 1 del presente estudio; y la muestra de sangre canina utilizada como control positivo.

Las secuencias parciales obtenidas se editaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® (Hall, 1999), se compararon mediante el algoritmo BLASTn con la base de datos del Centro Nacional de Información para Biotecnología (NCBI) y los alineamientos se realizaron con el programa MUSCLE (Edgar, 2004). Las secuencias parciales obtenidas y editadas, serán depositadas en la base de datos del NCBI.

Se construyó un árbol filogenético en el programa MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), con todas las secuencias parciales editadas (Kumar et al., 2016). Como modelo evolutivo se utilizó Kimura-2-parameter (Kimura, 1980) con una distribución gamma. Además, el método de análisis fue Neighbor-Joining y como prueba estadística se utilizó un valor de 1000 réplicas de remuestreo (bootstrap, BS). Como grupos externos para realizar el árbol filogenético, se utilizaron las secuencias parciales de *Trypanosoma erneyi* (JN040989) y *Trypanosoma dionisii* (FJ001662) depositadas en el GenBank. Las secuencias que se utilizaron para determinar el linaje de evolución de *T. cruzi* fueron: TcI (FJ001631), TcII(AF301912), TcIII (AF303660), TcIV (AY491761), TcV (AF228685), TcVI (AF245383) y TcBat (KT829450).

Cuadro 1. Protocolo “gradiente hacia abajo” para la PCR anidada del gen 18S rRNA de *T. cruzi*

Ciclos	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	2 min	95°C
2 ciclos*	30s	60°C
2 ciclos*	30s	58°C
2 ciclos*	30s	56°C
2 ciclos*	30s	54°C
2 ciclos*	30s	52°C
30 ciclos*	30s	50°C
Extensión final	5 min	72°C

* Cada ciclo tiene una etapa de desnaturalización de 30s a 95°C y una extensión de 1 minuto a 72°C

2.9 Electrocardiograma y ecocardiograma

Los caninos que resultaron positivos para *T. cruzi* en las pruebas serológicas o moleculares, fueron llevados al final del estudio al Hospital de Especies Menores y Silvestres (HEMS) de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA). Ahí, se les realizó una revisión general, un electrocardiograma y ecocardiograma a cargo de un veterinario con conocimiento en las pruebas.

3. Resultados

En ninguno de los dos grupos de caninos analizados durante los cuatro periodos, se observó la presencia de tripomastigotos en la sangre de los caninos mediante el microscopio de luz.

De los 25 caninos analizados del Grupo 1 (caninos que vivían en casas con reportes previos de la presencia del vector), tres seroconvirtieron en la primera visita (enero 2016) y otros tres caninos en la segunda visita (mayo 2016) (Figura 1). Los caninos seropositivos se presentaron en cuatro viviendas, en dos viviendas se presentaron dos caninos seropositivos en cada una. Los seis caninos (6/55, 10.9%) permanecieron seropositivos en HAI e IFI hasta el final del estudio, con títulos de anticuerpos entre 1:64 – 1:1024 en la HAI y 1:128 – 1:1024 en la IFI, por lo que se confirmaron como nuevos casos de tripanosomiasis canina en la comunidad de Getsemaní, determinándose una incidencia de un 24% dentro del Grupo 1. Solamente uno de los seis caninos seropositivos no se logró analizar en las últimas dos visitas debido a que falleció accidentalmente por envenenamiento durante el estudio. Los otros 19 caninos del Grupo 1 y todos los 30 caninos del Grupo 2 permanecieron seronegativos durante todo el estudio. En el Cuadro 2 se observan los resultados de los seis caninos seropositivos en las pruebas serológicas realizadas, con los títulos de anticuerpos en cada periodo durante todo el estudio.

Cuadro 2. Resultados de los seis caninos seropositivos en las dos pruebas serológicas en la comunidad de Getsemaní, en los años 2015 y 2016

Casa	Canino	Setiembre 2015		Enero 2016		Mayo 2016		Setiembre 2016		Diciembre 2016	
		HAI	IFI	HAI	IFI	HAI	IFI	HAI	IFI	HAI	IFI
4	1	-	-	-	-	+ (1:512)	+ (1:1024)	+ (1:512)	+ (1:512)	+ (1:512)	+ (1:1024)
4	2	-	-	-	-	+ (1:128)	+ (1:256)	+ (1:512)	+ (1:512)	+ (1:1024)	+ (1:512)
5	3	-	-	+ (1:512)	+ (1:512)	+ (1:1024)	+ (1:512)	+ (1:512)	+ (1:512)	+ (1:512)	+ (1:512)
7	4	-	-	+ (1:64)	+ (1:256)	+ (1:128)	+ (1:256)	+ (1:64)	+ (1:128)	+ (1:64)	+ (1:256)
7	5	-	-	+ (1:128)	+ (1:128)	+ (1:64)	+ (1:128)	NA	NA	NA	NA
22	6	-	-	-	-	+ (1:1024)	+ (1:1024)	+ (1:1024)	+ (1:512)	+ (1:1024)	+ (1:256)

NA: No analizado, debido a fallecimiento

Las características de los caninos que seroconvirtieron durante el estudio se muestran en el Cuadro 3. Los seis caninos se encontraron en cuatro viviendas diferentes y presentaron durante todo el estudio valores normales de frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, llenado capilar, membranas mucosas, hidratación, además todos se encontraban alertas y fueron dóciles. Un único canino (perro 2), presentó los linfonodos poplíteos aumentados en tamaño en dos de las revisiones (mayo y setiembre 2016) y otro canino (perro 4) mostró sonidos cardiacos anormales (soplo cardiaco) durante todo el estudio.

Cuadro 3. Características de los seis caninos seropositivos para *T. cruzi*

Casa	Canino	Raza	Sexo	Edad (años)	Talla	Condición corporal
4	1	SRD	Hembra	5	Pequeño	Buena
4	2	SRD	Hembra	6	Pequeño	Obesa
5	3	American Staffordshire Terrier	Macho	1	Grande	Buena
7	4	SRD	Macho	14	Mediano	Buena
7	5	Cocker Spaniel	Hembra	6	Mediano	Buena
22	6	SRD	Hembra	3	Grande	Buena

SRD: sin raza definida

De los 55 caninos analizados durante un año en la comunidad de Getsemaní, sólo uno (perro 2), perteneciente al Grupo 1, resultó positivo en la PCR de *T. cruzi*, en la segunda toma de muestra (mayo 2016) (Figura 2). Igualmente, en esa misma toma de muestra seroconvirtió y presentó los linfonodos poplíteos aumentados en tamaño. En la tercera revisión (setiembre 2016), el perro 2 continuó con aumento del tamaño de los linfonodos poplíteos, sin embargo resultó negativo para la PCR, mientras que la detección de anticuerpos se mantuvo hasta el final del estudio (Cuadro 4). Los linfonodos poplíteos se observaron de un tamaño normal en el perro 2, en la cuarta revisión (diciembre 2016).

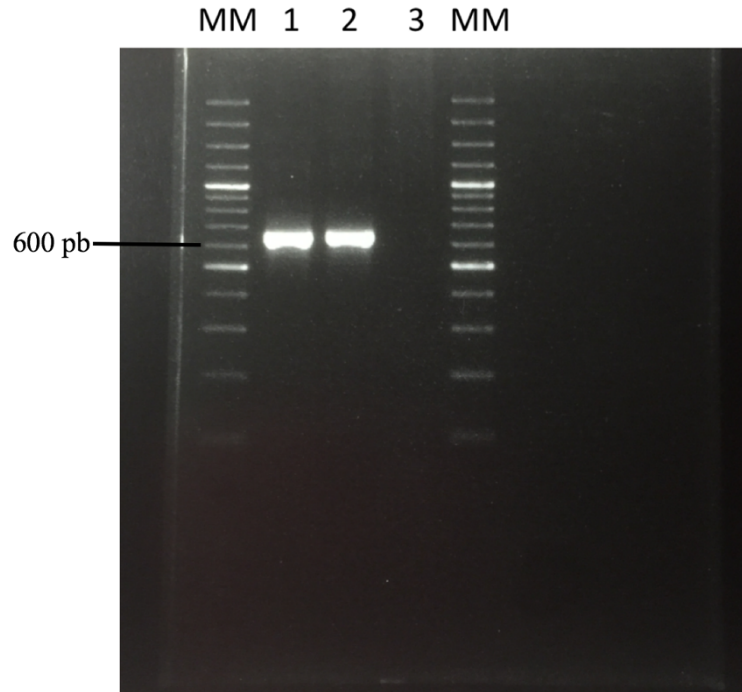


Figura 2. Análisis electroforético de la muestra canina positiva en la PCR de *T. cruzi*, en gel de agarosa al 1%, TBE 1X y tinción con GelRed. **MM:** Marcador de peso molecular (GenRuler 100 pb DNA Ladder Plus, Fermentas®), **1:** Control positivo, **2:** Muestra canina (perro 2), **3:** Control negativo

Cuadro 4. Resultados de PCR y serología del canino # 2 en la comunidad de Getsemaní, en los años 2015 y 2016

Casa	Canino	Setiembre 2015		Enero 2016		Mayo 2016		Setiembre 2016		Diciembre 2016	
		Serología	PCR	Serología	PCR	Serología	PCR	Serología	PCR	Serología	PCR
4	2	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-

La única muestra positiva mediante PCR en este estudio mostró un 100% (638/638 pb) de identidad nucleotídica con las secuencias del canino y los chinches del estudio del 2015 en la comunidad de Getsemaní. También, mostró un 100% (638/638 pb) de identidad nucleotídica con la secuencia aislada de un roedor en Texas, USA, y depositada en el GenBank (LT220278) (Anexo 4). Las secuencias de caninos y triatominos de Costa Rica, mostraron un 98% (586/589) de identidad nucleotídica con la secuencia obtenida de un murciélago en Brasil la cual pertenece al linaje TcI.

En la Figura 3, se observan los diferentes linajes de evolución de *T. cruzi* y las relaciones filogenéticas entre la secuencia obtenida del canino positivo a PCR en este estudio y las secuencias del canino control positivo y chinches del estudio del 2015 en la comunidad de Getsemaní. Se observa una asociación en todas las muestras provenientes de Getsemaní, así como con la muestra de un roedor en Estados Unidos (LT220278) y la secuencia del Linaje TcI (FJ001631), con un valor de remuestreo (bootstrap) del 97%, determinándose claramente las secuencias de Getsemaní como parte del linaje TcI de *T. cruzi*.

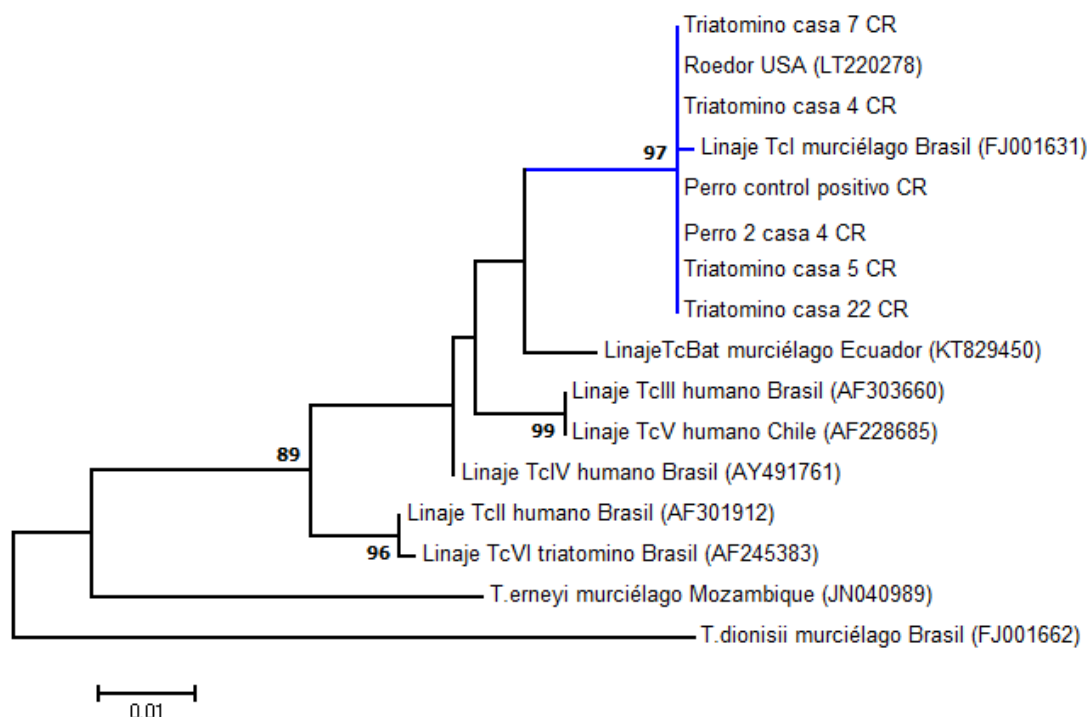


Figura 3. Árbol filogenético basado en las secuencias de 638 pb del gen 18S rRNA de las muestras de caninos y chinches de la comunidad de Getsemaní infectados con *T. cruzi*

A los cinco caninos sobrevivientes se les realizó al final del estudio un electrocardiograma y ecocardiograma. Desde la primera revisión en el 2015, cuando aún se encontraba seronegativo, al perro 4 se le detectó un soplo cardíaco. El soplo se siguió detectando durante todas las revisiones en el año 2016. El ecocardiograma y electrocardiograma confirmaron un problema cardíaco compatible con una degeneración valvular normal por la edad del perro. No se determinaron problemas cardíacos debido al parásito. Otro de los caninos (perro 3) presentó una disminución en la capacidad de contracción del corazón, lo cual es sugestivo y compatible con problemas cardíacos debido al establecimiento del parásito en el corazón. Los otros tres caninos no presentaron ningún hallazgo significativo en el ecocardiograma o electrocardiograma.

4. Discusión

La detección de seroconversiones en caninos en el presente estudio confirma que el ciclo de infección de *T. cruzi* se mantiene aún activo en la comunidad de Getsemaní (Nieto et al., 2009), y sugiere que la situación epidemiológica en la comunidad no ha variado mucho, pese a las intervenciones y recomendaciones que se brindaron en un estudio anterior realizado por la Universidad Nacional de Costa Rica (Dolz et al, 2015).

Las técnicas serológicas se consideran las pruebas más adecuadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, ya que los anticuerpos se logran detectar alrededor de los 7 a 15 días post infección y se mantienen por el resto de la vida, o el tiempo en que permanezcan infectados los individuos. Es importante tomar en cuenta que se recomienda utilizar al menos dos pruebas serológicas diferentes para diagnosticar una infección por *T. cruzi* (Nieto et al., 2009; Rodrigues & Borgues-Pereira, 2010; Tenney et al., 2014).

Según Eloy & Lucheis (2009), el encontrar nidos y vectores infectados en el área intra o peridomiciliar de las viviendas representa un riesgo de infección para los humanos y animales domésticos. *Triatoma dimidiata* fue determinado como el principal vector de *T. cruzi* en Getsemaní (Dolz et al., 2015), el cual tiene una alta predilección por la sangre canina en su alimentación (Calderón-Arguedas et al., 2001), por lo que los perros son uno de los principales hospedadores domésticos de estos vectores, y en condiciones naturales se infectarán con mayor frecuencia que los humanos. Debido a esto, los caninos pueden ser utilizados como centinelas para estimar las infecciones en la población humana (Barbabosa-Pliego et al., 2011; Castillo-Neyra et al., 2015).

La diferencia establecida en la aparición de seroconversiones en ambos grupos, podría atribuirse a la presencia de los vectores en los alrededores o dentro de las viviendas del Grupo 1 (único grupo en el que aparecieron perros seropositivos). No obstante, se recomienda realizar estudios más amplios, para confirmar que esta relación vector-huésped sea el principal factor de riesgo de infección por *T. cruzi* en los caninos de la comunidad de Getsemaní.

En México se ha reportado que las poblaciones de *T. dimidiata* son más abundantes en la época seca, y esto se ha asociado con una mayor colonización de los insectos en las viviendas (Dumonteil et al., 2002). En la comunidad de Getsemaní se presenta la estación seca aproximadamente desde el mes de diciembre hasta el mes de abril, con una temperatura promedio de 20.1°C (Moreno et al., 1998; Sandoval, 2011; Sandoval & Barrantes, 2012). En este estudio, todos los caninos seroconvirtieron en los primeros meses del año, lo que concuerda con la época seca en la comunidad de Getsemaní. Estos hallazgos sugieren, que en la comunidad podría haber una mayor cantidad de vectores en la época seca y estos podrían ser un factor de riesgo, ya que en zonas en donde se encuentran los vectores en mayor cantidad, la probabilidad de una infección por *T. cruzi* aumenta tanto para los caninos como para los humanos (Eloy & Lucheis, 2009).

Según la Norma de atención integral de la enfermedad de Chagas (2012), es fundamental la vigilancia entomológica para controlar la tripanosomiasis americana en Costa Rica. La vigilancia entomológica debe ser realizada por los servicios de salud con participación de la comunidad. En la Norma se establece que, en caso de que la población encuentre triatominos en sus hogares o alrededores, éstos deben ser llevados al EBAIS (Equipo Básico de Atención Integral en Salud) más cercano, para así remitirlos al INCIENSA (Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud) donde serán identificados y se les analizará el contenido intestinal para determinar si se encuentran infectados con *T. cruzi*. Una vez que se dé un reporte positivo por parte del INCIENSA, el personal del EBAIS coordinará con el personal de la Dirección del Área Rectora de Salud, para que se realicen las acciones de inspección y control de vectores en la vivienda y los análisis de los habitantes de la vivienda para iniciar un tratamiento. Por lo tanto, se recomienda a la población de la comunidad de Getsemaní, permanecer alerta ante la aparición de vectores en la vivienda y aplicar los protocolos de vigilancia entomológica establecidos en el país.

Además de la presencia del vector hematófago (*T. dimidiata*) en las viviendas, otros factores de riesgo son el tipo de construcción de las viviendas, su cercanía a cafetales o lotes baldíos, la presencia de materiales acumulados en el área intra o peridomiciliar, entre otros (Norma de atención integral de la enfermedad de Chagas, 2012). Dichos factores los cumplen muchas viviendas de la comunidad de Getsemaní, ya que las principales actividades en la zona son la agricultura, primordialmente cultivos de café y producción animal (bovinos y suinos), por lo que tiene grandes extensiones de potreros y bosques (Moreno et al., 1998; Sandoval, 2011; Sandoval & Barrantes, 2012). Todo esto se tendría que tomar en cuenta a la hora de realizar más estudios en la comunidad.

La fase indeterminada es muy común que se presente de forma asintomática en los caninos infectados con *T. cruzi*, los individuos no muestran mayores signos clínicos y muestran pocos cambios en el electrocardiograma o ecocardiograma. Asimismo, resultan con serología positiva (Rodrigues & Borges-Pereira, 2010; Ribeiro et al., 2012; Tenney et al., 2014; Meyers et al., 2017). Debido a que los seis caninos seropositivos en esta investigación, no manifestaron alguna sintomatología durante todas las revisiones en el transcurso del estudio, y en las pruebas de ecocardiograma y electrocardiograma solamente se evidenció un canino con una disminución en la capacidad de contracción del corazón, se sospecha que los perros se encontraban en la fase indeterminada de la enfermedad. El pronóstico de los caninos infectados es reservado, ya que por lo general desarrollan la fase crónica y mueren súbitamente (Greene, 2012).

La utilización de técnicas de diagnóstico directas para la detección de las formas parasitarias de *T. cruzi*, como por ejemplo la microscopía de luz, están recomendadas en casos en donde existen sospechas clínicas o epidemiológicas de una fase aguda, ya que es en las primeras semanas post infección en donde se van a observar una gran cantidad de tripomastigotos circulando en sangre y podrían detectarse mediante esta técnica. En las otras fases es más difícil el diagnóstico directo de los parásitos, debido a que la parasitemia disminuye conforme los parásitos van cambiando a su forma intracelular (Vega & Náquira, 2006; Abras et al., 2017). Es por esto, que es posible que los caninos seropositivos se encontraran en una fase indeterminada y por eso no se lograran observar tripomastigotos por medio de microscopía de luz durante todas las evaluaciones realizadas durante el estudio.

En la comunidad de Getsemaní se determinó, tanto en los vectores como en los caninos, la misma variante genética del parásito *T. cruzi*, el linaje TcI, lo cual concuerda con investigaciones previas, que lo reportan como el más común en Centroamérica, y el cual también ya se había reportado previamente en una zarigüeya, caninos, triatomínicos y humanos provenientes de cinco provincias de Costa Rica (Zuriaga et al., 2012; Dorn et al., 2017).

Los hallazgos del presente estudio indican que el ciclo del parásito *T. cruzi* se encuentra aún activo en la comunidad de Getsemaní, por lo que es importante continuar con los estudios epidemiológicos, de control y prevención, para disminuir la presencia e incidencia de las infecciones en la población canina.

Se recomienda que, tanto el sistema educativo (escuelas) como el de salud (EBAIS), eduquen, informen, concienticen e instruyan a la población en zonas endémicas sobre la vigilancia entomológica y la eliminación del vector y sus nidos en las zonas intra y peridomiciliares, ya que es conocido, que la transmisión de esta enfermedad hacia humanos se da comúnmente en ambientes domésticos donde se desenvuelven el parásito, el vector triatómico y animales reservorios (Balan et al., 2011); condiciones que se han comprobado que cumple la comunidad de Getsemaní.

5. Conclusiones

Se comprobó que el ciclo de infección de *T. cruzi* se mantiene aún activo en la comunidad de Getsemaní.

Se determinó una incidencia de 24% de tripanosomiasis canina en el Grupo 1 (caninos que habitan en viviendas con reportes previos del vector en ellas), estudiados en la comunidad de Getsemaní.

Se evidenció tanto en los perros, como en los triatomíneos de la comunidad de Getsemaní, la presencia del mismo linaje de evolución de *T. cruzi*, el TcI.

6. Recomendaciones

Informar al sistema de salud y a la población de la comunidad de Getsemaní sobre la incidencia de tripanosomiasis canina en dicha comunidad.

Educar a los pobladores sobre la enfermedad y concientizar a la eliminación de los vectores en sus domicilios y peridomicilios.

Realizar más estudios en Costa Rica para poder determinar cómo se desarrolla la infección de *T. cruzi* en los caninos del país.

7. Referencias bibliográficas

- Abad-Franch, F., Santos, W.S. & Schofield, C.J. (2010). Research needs for Chagas disease prevention. *Acta Trop.* 115(1), 44-54.
- Abras, A., Muñoz, C., Ballart, C., Berenguer, P., Llovet, T., Herrero, M., Tebar, S., Pinazo, M.J., Posada, E., Martí, C., Fumadó, V., Bosch, J., Coll, O., Juncosa, T., Ginovart, G., Armengol, J., Gascón, J., Portús, M. & Gállego, M. (2017). Towards a new strategy for the diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Clinical Microbiology.* JCM-02248.
- Aleman, A., Guerra, T., Maikis, T.J., Milholland, M.T., Castro-Arellano, I., Forstner, M.R.J. & Hahn, D. (2017). The Prevalence of *Trypanosoma cruzi*, the Causal Agent of Chagas Disease, in Texas Rodent Populations. *EcoHealth.* 14(1), 130-143.
- Barbabosa-Pliego, A., Campos, P., Olivares, D., Aparicio-Burgos, J.E., Montes de Oca-Jiménez, R., Martínez-Castañeda, J.S., Ochoa-García, L., Guzmán-Bracho, C., Estrada Franco, J.G, Garg, N.J. & Vazquez, J.C. (2011). Prevalence of *Trypanosoma cruzi* in dogs (*Canis familiaris*) and triatomines during 2008 in a sanitary region of the State of Mexico, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 11(2), 151-156.
- Balan, L.U., Yerbes, Medina, I., Novelo, M.A., Balmes, J., Pascual, A., Hernández, O., Lopez, R. & Monteón, V. (2011). Higher seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs than in humans in an urban area of Campeche, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 11(7), 843-844.
- Bautista-López, N. L., Ndao, M., Vázquez, F., Nara, T., Annoura, T., Hardie, D.B., Borchers, C.H. & Jardim, A. (2016). Characterization and diagnostic application of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote excreted-secreted antigens shed in extracellular vesicles released from infected mammalian cells. *Journal of Clinical Microbiology.* JCM-01649.

- Berrocal-Avila, A., Morales-Acuña, J.A., Cordero, V. & Villalobos, C. (1993). Miocarditis aguda chagásica en caninos de Costa Rica. Acute myocarditis due to *Trypanosoma cruzi* in dogs in Costa Rica. *Revista de Ciencias Veterinarias (Heredia)*. 15(1), 51-59.
- Calderón-Arguedas, O., Chinchilla, M., García, F. & Vargas, M. (2001). Preferencias alimentarias de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) procedente de la meseta central de Costa Rica a finales del siglo XX. *Parasitología al día*. 25(3-4), 78-81.
- Castillo-Neyra, R., Chou Chu, L., Quispe-Machaca, V., Ancca-Juarez, J., Chavez Malaga, F.S., Bastos Mazuelos, M., Naquira, C., Bern, C., Gilman, R.H. & Levy, M.Z. (2015). The potential of canine sentinels for reemerging *Trypanosoma cruzi* transmission. *Prev. Vet. Med.* 120(3), 349-356.
- Dolz, G., Urbina, A., Herrero, M., Mendoza, N., Argüello, M. y Madrigal, V. (2015). Distribución del *Trypanosoma cruzi* usando como indicadores su presencia en perros y en vectores. San José, C.R. Colegio de Periodistas de Costa Rica. Oct. 10.
- Dorn, P. L., McClure, A. G., Gallaspy, M.D., Waleckx, E., Woods, A.S., Monroy, M.C. & Stevens, L. (2017). The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia. *PLoS neglected tropical diseases*. 11(9), e0005878.
- Dumonteil, E., Gourbière, S., Barrera-Pérez, M., Rodríguez-Félix, E., Ruiz-Piña, H., Baños-Lopez, O., Ramirez-Sierra, M.J., Menu, F. & Rabinovich, J.E. (2002). Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan peninsula of Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 67(2), 176-183.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*. 32(5), 1792-1797.

- Eloy, L.J. & Lucheis, S.B. (2009). Canine trypanosomiasis: etiology of infection and implications for public health. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 15(4), 589-611.
- Galvao, C & Justi, S.A. (2015). An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Trop*. 151, 116-125.
- Greene, C. (2012). *Infectious diseases of the dog and cat*. 4 ed. United States, Elsevier.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: to user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41, 95-98.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16, 111-120.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*. 33(7), 1870-1874.
- Lizundia, R., Picado, A., Cordero, M., Calderon, A., Deborggraeve, S., Montenegro, V.M. & Urbina, A. (2014). Molecular and serological rapid tests as markers of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs in Costa Rica. *Tropical Parasitology*. 4(2), 111.
- Meyers, A.C., Meinders, M. & Hamer, S.A. (2017). Widespread *Trypanosoma cruzi* infection in government working dogs along the Texas-Mexico border: Discordant serology, parasite genotyping and associated vectors. *PLoS neglected tropical diseases*. 11(8), e0005819.

- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). (2008). Listado de enfermedades animales de declaración obligatoria. Decreto No 34669-MAG. Presidencia de la República y Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica.
- Montenegro, V.M., Jimenez, M., Dias, J.C. & Zeledon, R. (2002). Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97, 491-494.
- Moreno Álvarez R., Carballo Hernández, M.A. & Vargas Lobo, F. (1998). Mejoramiento ambiental de la parte alta de la cuenca del río Segundo para la comunidad de Getsemaní de San Rafael de Heredia. Proyecto Integral. Práctica de formulación, administración y evaluación de proyectos I y II. Facultad de Ciencias Sociales. Escuela de Planificación económica y social. Universidad Nacional. Costa Rica.
- Muñoz-San Martín, C., Apt, W. & Zulantay, I. (2017). Real-time PCR strategy for the identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units directly in chronically infected human blood. *Infection, Genetics and Evolution*. 49, 300-308.
- Murphy, W.J. & O'Brien, S.J. (2007). Designing and optimizing comparative anchor primers for comparative gene mapping and phylogenetic inference. *Nature Protocols*. 2(11), 3022-3030.
- Nieto, P.D., Boughton, R., Dorn, P.L., Steurer, F., Raychaudhuri, S., Esfandiari, J., Gonçalves, E., Diaz, J. & Malone, J.B. (2009). Comparison of two immunochromatographic assays and the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs in south central Louisiana. *Veterinary parasitology*. 165(3), 241-247.
- Norma de atención integral de la Enfermedad de Chagas. (2012). Decreto Ejecutivo N° 37269-S. Presidencia de la República y Ministerio de Salud. Gobierno de Costa Rica.

- Noyes, H.A., Stevens, J.R., Teixeira, M., Phelan, J. & Holz, P. (1999). A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. *Int. J. Parasitol.* 29(2), 331-339.
- Pinto, C.M., Ocaña-Mayorga, S., Tapia, E.E., Lobos, S.E., Zurita, A.P., Aguirre-Villacís, F., MacDonald, A., Villacís, A.G., Lima, L., Teixeira, M.M.G., Grijalva, M.J. & Perkins, S.L. (2015). Bats, Trypanosomes, and Triatomines in Ecuador: new insights into the diversity, transmission, and origins of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. *Plos One.* 10(10), 1-13.
- Ribeiro, A.L., Nunes, M.P., Teixeira, M.M. & Rocha, M.O. (2012). Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology.* 9(10), 576-589.
- Rodrigues, J. & Borgues-Pereira, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its Discovery. A systemic review. *Acta Trop.*, 115, 5-3.
- Sandoval, L. (2011). Inicio de la época reproductiva y tiempo de defensa del territorio en machos de *Colinus leucopogon* (Galliformes: Odontophoridae). *Rev. Biol. Trop.* 59(1), 363-372.
- Sandoval, L. & Barrantes, G. (2012). Characteristics of male Spot-bellied Bobwhite (*Colinus leucopogon*) song during territory establishment. *Journal of Ornithology.* 153(2), 547-554.
- Tanowitz, H.B. & Weiss, L.M. (2017). A New Development in *Trypanosoma cruzi* Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology.* JCM-02353.
- Telleria, J. & Tibayrenc, M. (2010). American trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research. Elsevier.

- Tenney, T.D., Curtis-Robles, R., Snowden, K.F. & Hamer, S.A. (2014). Shelter dogs as sentinels for *Trypanosoma cruzi* transmission across Texas. *Emerging infectious diseases*. 20(8), 1323.
- Vega, S. & Náquira, C. (2006). Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Tripanosomiasis americana (Enfermedad De Chagas). Inst Nac de Salud. Lima. Perú.
- Zeledón, R., Hanson, P. & Zumbado, M. (2016). Guía de artrópodos de importancia médica y veterinaria. Editorial Universidad Estatal a distancia. San José. Costa Rica.
- Zuriaga, M.Á., Blandón-Naranjo, M., Valerio-Campos, I., Salas, R., Zeledón, R. & Bargas, M.D. (2012). Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* and infection rate of the vector *Triatoma dimidiata* in Costa Rica. *Parasitology research*. 111(4), 1615-1620.

DISCUSIÓN GENERAL

La investigación I, es el primer estudio que analiza la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en caninos de 28 cantones de Costa Rica, reportándose por primera vez la presencia de perros seropositivos en los cantones de Mora, Liberia y Golfito.

Hasta la fecha solamente se han realizado algunos estudios serológicos puntuales y no sistemáticos en caninos en 12 cantones de Costa Rica, donde previamente se habían reportado casos de tripanosomiasis canina. Estos cantones analizados se encontraban en su mayoría en el Valle Central (Berrocal-Avila et al., 1993, Montenegro et al., 2002; Villegas, 2008; Lizundia et al., 2014). El hallazgo de perros seropositivos en tres cantones adicionales, en los que no existían reportes previos de casos de tripanosomiasis canina es importante, ya que brinda información sobre la presencia de *T. cruzi* en caninos en estos cantones, lo que debe de ser comunicado a los veterinarios y a las autoridades de salud pública, para que consideren esta parasitosis como diagnóstico diferencial en cuadros clínicos compatibles.

Actualmente se desconoce la presencia de casos de tripanosomiasis canina en 47 cantones en Costa Rica, aunque en 22 de estos cantones se ha reportado con anterioridad la presencia de *T. dimidiata* (Zeledón, 1981; Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), 2017). En total, se ha reportado la presencia del vector en 50 (61%) del total de 82 cantones del país, por lo que se considera que está distribuido en la mayor parte del territorio de Costa Rica.

La detección de anticuerpos contra *T. cruzi* en los perros, indican tanto exposición al agente como también infección de los caninos con el parásito (Tenney et al., 2014). Para el diagnóstico de infecciones de *T. cruzi* se recomienda utilizar pruebas serológicas, ya que existe mayor probabilidad de detectar los anticuerpos que el parásito, debido a que los anticuerpos se producirán durante toda la vida de los caninos y se detectarán en las muestras de sangre, puesto que para animales no hay disponible tratamiento que elimine la infección (Tenney et al., 2014).

La parasitemia fluctúa durante la infección en los caninos, aunque generalmente ocurre en bajas cantidades, especialmente en la fase crónica, lo cual hace difícil el diagnóstico de animales infectados. El diagnóstico del parásito en sangre se realiza mediante técnicas directas como la microscopía de luz, métodos de cultivo y pruebas moleculares, como también por medio del xenodiagnóstico (Eloy & Lucheis, 2009).

Aunque *T. dimidiata* es el principal vector de la tripanosomiasis americana en Costa Rica, y tiene una alta predilección por sangre canina para su alimentación, parecen infectarse un bajo número de triatominos al alimentarse con sangre canina, ya que se demostró que los caninos tienen una más baja infectividad (11.3%) que animales silvestres como los didélfidos, en los cuales se encontró una infectividad del 44% (Calderón-Arguedas et al., 2001). En un estudio realizado en Costa Rica en el 2002, solamente un 5.5% de los perros analizados se diagnosticaron como positivos a *T. cruzi* mediante xenodiagnóstico, mientras que un 27.7% de estos caninos mostraron anticuerpos contra el parásito (Montenegro et al., 2002). Según estos estudios la mayoría de perros seropositivos representan un riesgo bajo de infección para los triatominos. A pesar de esto, es importante determinar los cantones con caninos infectados con el parásito, ya que estos animales representan una fuente de infección para los vectores, existiendo la posibilidad de infección de otros caninos y hasta de seres humanos.

La razón por la cual no se detectó signos clínicos compatibles con la tripanosomiasis en los caninos seropositivos, probablemente se debe a que éstos se encontraban en la fase intermedia de la enfermedad, la cual se ha reportado que ocurre de manera asintomática, donde los parásitos se replican en las células musculares, y al no haber gran daño no se evidencia la sintomatología cardíaca. En el transcurso de la infección, los individuos manifestarán con mayor grado la sintomatología clínica (Tenney et al., 2014; Meyers et al., 2017).

En la investigación I, dos caninos mostraron mucosas pálidas o muy pálidas, en éstos se encontraron garrapatas el día de la revisión clínica, lo cual pudo haber sido la razón del hallazgo clínico o debido a alguna otra infección concomitante producida por algún hemoparásito transmitido por garrapatas (Barrantes-González et al., 2016b).

Los animales detectados como seropositivos en el presente trabajo fueron sobre todo animales jóvenes, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura, que las infecciones por *T. cruzi* se dan sobre todo en perros jóvenes, ya sea, porque los cachorros fueron infectados transplacentariamente, o bien, porque ingirieron los triatominos por accidente al jugar con ellos (Greene, 2012; Berrizbeitia et al., 2013; Rodrigues, 2015). También, la fase aguda de la enfermedad parece ocurrir generalmente en animales jóvenes, los cuales presentarán altos títulos de anticuerpos debido a la infección reciente, lo cual concuerda con lo encontrado en el presente trabajo (De Lana et al., 1992; Greene, 2012).

Una limitante del estudio I, fue el no contar con la información sobre la presencia del vector en la vivienda de los caninos, así como otros datos tales como el tipo de construcción de la vivienda, la cercanía de la vivienda a cafetales o lotes baldíos, y la presencia de materiales acumulados en el área intra o peridomiciliar, entre otros, que se consideran como factores de riesgo de la tripanosomiasis (Norma de atención integral de la enfermedad de Chagas, 2012). Esta información hubiera sido útil para relacionar las infecciones en los caninos con estos factores de riesgo. Sin embargo, es importante resaltar, que en tres de los cantones, en los cuales se reportaron por primera vez caninos seropositivos, se había reportado previamente la presencia del vector (Mora, San Rafael y Liberia) (Zeledón, 1981; Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), 2017).

Golfito es el único cantón de Costa Rica, en el que hasta el momento no se habían reportado vectores triatominos, pero se determinó un canino seropositivo. Esto puede deberse, ya sea, que el vector está presente en el cantón, pero que no se ha investigado y encontrado hasta la fecha; o que el canino se haya infectado en otra zona, y luego llegara a residir al cantón de Golfito. Esto no pudo ser investigado, ya que el día de la toma de muestra los propietarios no indicaron cuánto tiempo llevaba el canino conviviendo con ellos en Golfito. Sin embargo, los propietarios reportaron que el perro vivía la mayor parte del tiempo afuera y en los alrededores de la casa, por lo que, en caso de encontrarse el vector en la zona, habría tenido la oportunidad de ingerirlo accidentalmente (Greene, 2012; Berrizbeitia et al., 2013; Rodrigues, 2015).

En el cantón de San Rafael de Heredia, se conoce la presencia de vectores triatominos infectados con el parásito *T. cruzi* desde 1952 (Berrocal-Avila et al., 1993). En 1993 se reportó el primer caso de tripanosomiasis aguda en un cachorro de 9 meses, el cual murió súbitamente, y en la necropsia se encontraron alteraciones cardiacas, confirmando *T. cruzi* como la causa de muerte. Además, en la vivienda del cachorro se encontraron vectores positivos (Berrocal-Avila et al., 1993). Otros tres estudios serológicos, también encontraron caninos positivos en este cantón (Montenegro et al., 2002; Lizundia et al., 2014; Dolz et al., 2015), lo que sugiere que este cantón reúne las condiciones que favorecen el establecimiento de la enfermedad.

La enfermedad de Chagas ha sido muy poco estudiada en Costa Rica, tanto en humanos como en caninos. Es hasta en el año 2003, que la enfermedad de Chagas se declara como un problema prioritario de salud pública y se inicia con el tamizaje del 100% de las donaciones sanguíneas (Norma de atención integral de la enfermedad de Chagas, 2012; Campos-Fuentes & Calvo-Fonseca, 2013). En el 2005, la OMS declaró la enfermedad de Chagas como una enfermedad tropical desatendida, esto con el fin de implementar medidas de control.

Las infecciones por *T. cruzi* en humanos son de reporte obligatorio en Costa Rica y la vigilancia epidemiológica de los casos se realiza en forma pasiva (Norma de atención integral de la enfermedad de Chagas, 2012). En contraste, la enfermedad de Chagas no es de reporte obligatorio en animales ni tampoco existen programas para su vigilancia epidemiológica en nuestro país (Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), 2008).

Por ser ésta una enfermedad zoonótica, y los perros los principales hospedadores domésticos de la enfermedad, que además son infectados en condiciones naturales más frecuentemente que los humanos, se recomienda utilizar los caninos como centinelas para estimar las infecciones en humanos (Barbabosa-Pliego et al., 2011; Castillo-Neyra et al., 2015).

Los resultados generados en el estudio I, amplían la información sobre la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en caninos de Costa Rica y presentan la situación actual de la tripanosomiasis canina en el país. Se recomienda realizar más investigaciones en caninos, sobre todo sistemáticas y de amplia cobertura en Costa Rica, para poder determinar las zonas o cantones endémicos de la enfermedad de Chagas.

En la investigación II, la detección de seroconversiones en caninos confirma que el ciclo de infección de *T. cruzi* se mantiene aún activo en la comunidad de Getsemaní (Nieto et al., 2009), y sugiere que la situación epidemiológica en la comunidad no ha variado mucho, pese a las intervenciones y recomendaciones que se brindaron en un estudio anterior realizado por la Universidad Nacional de Costa Rica (Dolz et al, 2015).

Las técnicas serológicas se consideran las pruebas más adecuadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, ya que los anticuerpos se logran detectar alrededor de los 7 a 15 días post infección y se mantienen por el resto de la vida, o el tiempo en que permanezcan infectados los individuos. Es importante tomar en cuenta que se recomienda utilizar al menos dos pruebas serológicas diferentes para diagnosticar una infección por *T. cruzi* (Nieto et al., 2009; Rodrigues & Borgues-Pereira, 2010; Tenney et al., 2014).

Según Eloy & Lucheis (2009), el encontrar nidos y vectores infectados en el área intra o peridomiciliar de las viviendas representa un riesgo de infección para los humanos y animales domésticos. *Triatoma dimidiata* fue determinado como el principal vector de *T. cruzi* en Getsemaní (Dolz et al., 2015), el cual tiene una alta predilección por la sangre canina en su alimentación (Calderón-Arguedas et al., 2001), por lo que los perros son uno de los principales hospedadores domésticos de estos vectores, y en condiciones naturales se infectarán con mayor frecuencia que los humanos. Debido a esto, los caninos pueden ser utilizados como centinelas para estimar las infecciones en la población humana (Barbabosa-Pliego et al., 2011; Castillo-Neyra et al., 2015).

La diferencia establecida en la aparición de seroconversiones en ambos grupos, podría atribuirse a la presencia de los vectores en los alrededores o dentro de las viviendas del Grupo 1 (único grupo en el que aparecieron perros seropositivos). No obstante, se recomienda realizar estudios más amplios, para confirmar que esta relación vector-huésped sea el principal factor de riesgo de infección por *T. cruzi* en los caninos de la comunidad de Getsemaní.

En México se ha reportado que las poblaciones de *T. dimidiata* son más abundantes en la época seca, y esto se ha asociado con una mayor colonización de los insectos en las viviendas (Dumonteil et al., 2002). En la comunidad de Getsemaní se presenta la estación seca aproximadamente desde el mes de diciembre hasta el mes de abril, con una temperatura promedio de 20.1°C (Moreno et al., 1998; Sandoval, 2011; Sandoval & Barrantes, 2012). En este el estudio II, todos los caninos seroconvirtieron en los primeros meses del año, lo que concuerda con la época seca en la comunidad de Getsemaní. Estos hallazgos sugieren, que en la comunidad podría haber una mayor cantidad de vectores en la época seca y estos podrían ser un factor de riesgo, ya que en zonas en donde se encuentran los vectores en mayor cantidad, la probabilidad de una infección por *T. cruzi* aumenta tanto para los caninos como para los humanos (Eloy & Lucheis, 2009).

Según la Norma de atención integral de la enfermedad de Chagas (2012), es fundamental la vigilancia entomológica para controlar la tripanosomiasis americana en Costa Rica. La vigilancia entomológica debe ser realizada por los servicios de salud con participación de la comunidad. En la Norma se establece que, en caso de que la población encuentre triatominos en sus hogares o alrededores, éstos deben ser llevados al EBAIS (Equipo Básico de Atención Integral en Salud) más cercano, para así remitirlos al INCIENSA (Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud) donde serán identificados y se les analizará el contenido intestinal para determinar si se encuentran infectados con *T. cruzi*. Una vez que se dé un reporte positivo por parte del INCIENSA, el personal del EBAIS coordinará con el personal de la Dirección del Área Rectora de Salud, para que se realicen las acciones de inspección y control de vectores en la vivienda y los análisis de los habitantes de la vivienda para iniciar un tratamiento. Por lo tanto, se recomienda a la población de la comunidad de Getsemaní, permanecer alerta ante la aparición de vectores en la vivienda y aplicar los protocolos de vigilancia entomológica establecidos en el país.

Además de la presencia del vector hematófago (*T. dimidiata*) en las viviendas, otros factores de riesgo son el tipo de construcción de las viviendas, su cercanía a cafetales o lotes baldíos, la presencia de materiales acumulados en el área intra o peridomiciliar, entre otros (Norma de atención integral de la enfermedad de Chagas, 2012). Dichos factores los cumplen muchas viviendas de la comunidad de Getsemaní, ya que las principales actividades en la zona son la agricultura, primordialmente cultivos de café y producción animal (bovinos y suinos), por lo que tiene grandes extensiones de potreros y bosques (Moreno et al., 1998; Sandoval, 2011; Sandoval & Barrantes, 2012). Todo esto se tendría que tomar en cuenta a la hora de realizar más estudios en la comunidad.

La fase indeterminada es muy común que se presente de forma asintomática en los caninos infectados con *T. cruzi*, los individuos no muestran mayores signos clínicos y muestran pocos cambios en el electrocardiograma o ecocardiograma. Asimismo, resultan con serología positiva (Rodrigues & Borges-Pereira, 2010; Ribeiro et al., 2012; Tenney et al., 2014; Meyers et al., 2017).

Debido a que los seis caninos seropositivos en la investigación II, no manifestaron alguna sintomatología durante todas las revisiones en el transcurso del estudio, y en las pruebas de ecocardiograma y electrocardiograma solamente se evidenció un canino con una disminución en la capacidad de contracción del corazón, se sospecha que los perros se encontraban en la fase indeterminada de la enfermedad. El pronóstico de los caninos infectados es reservado, ya que por lo general desarrollan la fase crónica y mueren súbitamente (Greene, 2012).

La utilización de técnicas de diagnóstico directas para la detección de las formas parasitarias de *T. cruzi*, como por ejemplo la microscopía de luz, están recomendadas en casos en donde existen sospechas clínicas o epidemiológicas de una fase aguda, ya que es en las primeras semanas post infección en donde se van a observar una gran cantidad de tripomastigotos circulando en sangre y podrían detectarse mediante esta técnica. En las otras fases es más difícil el diagnóstico directo de los parásitos, debido a que la parasitemia disminuye conforme los parásitos van cambiando a su forma intracelular (Vega & Náquira, 2006; Abras et al., 2017). Es por esto, que es posible que los caninos seropositivos se encontraran en una fase indeterminada y por eso no se lograran observar tripomastigotos por medio de microscopía de luz durante todas las evaluaciones realizadas durante el estudio II.

En la comunidad de Getsemaní se determinó, tanto en los vectores como en los caninos, la misma variante genética del parásito *T. cruzi*, el linaje TcI, lo cual concuerda con investigaciones previas, que lo reportan como el más común en Centroamérica, y el cual también ya se había reportado previamente en una zarigüeya, caninos, triatominos y humanos provenientes de cinco provincias de Costa Rica (Zuriaga et al., 2012; Dorn et al., 2017).

Los hallazgos del estudio II indican que el ciclo del parásito *T. cruzi* se encuentra aún activo en la comunidad de Getsemaní, por lo que es importante continuar con los estudios epidemiológicos, de control y prevención, para disminuir la presencia e incidencia de las infecciones en la población canina.

Se recomienda que, tanto el sistema educativo (escuelas) como el de salud (EBAIS), eduquen, informen, concienticen e instruyan a la población en zonas endémicas sobre la vigilancia entomológica y la eliminación del vector y sus nidos en las zonas intra y peridomiciliares, ya que es conocido, que la transmisión de esta enfermedad hacia humanos se da comúnmente en ambientes domésticos donde se desenvuelven el parásito, el vector triatomino y animales reservorios (Balan et al., 2011); condiciones que se han comprobado que cumple la comunidad de Getsemaní.

CONCLUSIONES GENERALES

Se estableció la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en cinco de 427 caninos provenientes de cuatro cantones distintos (Mora, San Rafael de Heredia, Liberia y Golfito).

Se determinó una seroprevalencia de 1.17% de tripanosomiasis canina en Costa Rica.

Se reportó por primera vez la presencia de caninos seropositivos a *T. cruzi* en tres cantones (Mora, Liberia y Golfito), en los cuales no se había reportado aún la presencia del parásito en perros.

Se confirmó que el ciclo de infección de *T. cruzi* se mantiene aún activo en la comunidad de Getsemaní.

Se estableció una incidencia de 24% de tripanosomiasis canina en el Grupo 1 (caninos que habitan en viviendas con reportes previos del vector en ellas), estudiados en la comunidad de Getsemaní.

Se evidenció tanto en los perros, como en los triatominos de la comunidad de Getsemaní, la presencia del mismo linaje de evolución de *T. cruzi*, el TcI.

RECOMENDACIONES GENERALES

Comunicar a la comunidad de médicos veterinarios sobre los resultados obtenidos, para que se tome en cuenta la enfermedad de Chagas como un diagnóstico diferencial, en perros que viven en zonas donde se han reportado casos de tripanosomiasis canina.

Realizar estudios sistemáticos y de amplia cobertura en Costa Rica, no sólo en los cantones donde se han dado reportes previos de casos de tripanosomiasis canina, para poder determinar las zonas o cantones endémicos que representan un foco de infección para otras localidades.

Informar al sistema de salud y a la población de la comunidad de Getsemaní sobre la incidencia de tripanosomiasis canina en dicha comunidad.

Educar a los pobladores sobre la enfermedad y concientizar a la eliminación de los vectores en sus domicilios y peridomicilios.

Ejecutar más estudios en Costa Rica para poder determinar cómo se desarrolla la infección de *T. cruzi* en los caninos del país.

ANEXOS

Anexo 1. Información y ficha clínica realizada a cada canino que participó en el estudio en los parques recreativos de Costa Rica.

Número de formulario:



**UNIVERSIDAD NACIONAL
COSTA RICA**
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
Proyecto de Tesis



FECHA:		LUGAR DE MUESTREO:	
FORMULARIO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS GENERALES			
<p>Toda la información que usted brinde, será absolutamente confidencial y será de uso estricto médico-veterinario.</p>			
INFORMACIÓN PERSONAL DEL PROPIETARIO			
Nombre del			
Lugar de habitación actual:	Provincia:	Cantón:	
Número de teléfono:	Correo electrónico:		
INFORMACIÓN PERSONAL DEL PACIENTE			
Nombre del paciente:	Raza:	Sexo:	Edad:
Lugar de habitación en el hogar:	<input type="checkbox"/> Fuera de la casa <input type="checkbox"/> Dentro de la casa		
Cantidad de animales con los que habita:		Cantidad de personas con los que habita:	
Detalle la clase de animales con los que habita: (1 gato, 2 perros, 1 caballo, etc)			

¿El paciente ha tenido alguno de los siguientes parásitos en el pasado?						
Garrapatas:	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Ha sido tratado contra ellas?	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Con qué?
Pulgas:	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Ha sido tratado contra ellas?	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Con qué?
Piojos:	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Ha sido tratado contra ellos?	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Con qué?
Intestinales:	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Ha sido tratado contra ellos?	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Con qué?
¿Con qué regularidad visita el parque?						
Hace años	<input type="checkbox"/>	Hace meses	<input type="checkbox"/>	Hace menos de 4 semanas	<input type="checkbox"/>	Ésta es la primera vez
						<input type="checkbox"/>
¿Alguna vez el paciente ha sido diagnosticado con EHRLIQUIOSIS (LA ENFERMEDAD DE LAS GARRAPATAS)?						
<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Hace cuánto tiempo?	¿Ha recibido tratamiento?	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Con qué?
¿Alguna vez su veterinario pudo tener la sospecha de que su mascota tuviera EHRLIQUIOSIS (LA ENFERMEDAD DE LAS GARRAPATAS)?						
<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Hace cuánto tiempo?	¿Recibió algún tratamiento?	<input type="checkbox"/> SÍ	<input type="checkbox"/> NO	¿Con qué?
¿Alguna vez el paciente ha presentado los siguientes síntomas?						
Anorexia (pérdida del apetito)	<input type="checkbox"/>	Cualquier tipo de sangrado	<input type="checkbox"/>	Problemas respiratorios	<input type="checkbox"/>	
Fiebre	<input type="checkbox"/>	Manchas rojas en la piel	<input type="checkbox"/>	Sangre en la orina	<input type="checkbox"/>	
Debilidad	<input type="checkbox"/>	Conjuntivitis	<input type="checkbox"/>	Problemas para caminar	<input type="checkbox"/>	
Depresión	<input type="checkbox"/>	Inflamación en los testículos	<input type="checkbox"/>	Picazón	<input type="checkbox"/>	
Pérdida de pelo	<input type="checkbox"/>	Tumores o pelotas	<input type="checkbox"/>	Diarrea	<input type="checkbox"/>	

Número de ficha:

FICHA CLÍNICA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS DE PERROS EN PARQUES RECREATIVOS

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA

Números de muestras	Rojos:		Morados:	
Número de muestra garrapatas:				
Número de muestra pulgas:				
Número de muestra piojos:				
Número de muestra heces:				

INFORMACIÓN GENERAL DEL PACIENTE

Color de pelaje:						
Condición corporal:	Caquexia <input type="checkbox"/>	Mala <input type="checkbox"/>	Regular <input type="checkbox"/>	Buena <input type="checkbox"/>	Obesidad <input type="checkbox"/>	
Actitud:	Deprimido <input type="checkbox"/>	Débil <input type="checkbox"/>	Dócil <input type="checkbox"/>	Alerta <input type="checkbox"/>	Agresivo <input type="checkbox"/>	
Membranas Mucosas:	Muy pálidas <input type="checkbox"/>	Pálidas <input type="checkbox"/>	Rosadas <input type="checkbox"/>	Ictéricas <input type="checkbox"/>		
Tiempo de llenado capilar:						
Temperatura:						
Indicios de:	Epistaxis <input type="checkbox"/>	Petequias <input type="checkbox"/>	Equimosis <input type="checkbox"/>	Metrorragia <input type="checkbox"/>	Conjuntivitis <input type="checkbox"/>	Edema escrotal <input type="checkbox"/>
	Disnea <input type="checkbox"/>	Tos <input type="checkbox"/>	Cianosis <input type="checkbox"/>	Ataxia <input type="checkbox"/>	Hematuria <input type="checkbox"/>	Alopecia <input type="checkbox"/>
	Linfadenomegalia <input type="checkbox"/>	Artritis <input type="checkbox"/>	Diarrea <input type="checkbox"/>			

GARRAPATAS <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Cantidad de infestación	1-10 <input type="checkbox"/>	11-25 <input type="checkbox"/>	25-50 <input type="checkbox"/>	Más de 50 <input type="checkbox"/>
PULGAS <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Cantidad de infestación	1-10 <input type="checkbox"/>	11-25 <input type="checkbox"/>	25-50 <input type="checkbox"/>	Más de 50 <input type="checkbox"/>
PIOJOS <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Cantidad de infestación	1-10 <input type="checkbox"/>	11-25 <input type="checkbox"/>	25-50 <input type="checkbox"/>	Más de 50 <input type="checkbox"/>

OBSERVACIONES ADICIONALES

--

Anexo 2. Consentimiento informado para los propietarios participantes en el estudio de la Enfermedad de Chagas en caninos de la comunidad de Getsemaní.



UNIVERSIDAD NACIONAL
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
PROGRAMA INTEGRADO EN MEDICINA POBLACIONAL

Teléfonos:(506) 2562-4508 / 2562- 4553 Telefax: (506) 2237-5229

FÓRMULA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Distribución espacio-temporal del *Trypanosoma cruzi* en perros y chinches en la comunidad de Getsemaní, San Rafael, Heredia

Código de proyecto: 0239-14

Nombre del Investigador Principal: Dra. Gaby Dolz

Nombre del participante: _____

A. PROPÓSITO DEL PROYECTO:

Este estudio es realizado por la Dra. Gaby Dolz, el Dr. Marco Herrero Acosta, y la Dra. Andrea Urbina Villalobos, profesores e investigadores de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. En conjunto con los estudiantes de Posgrado Milena Arguello, Vanessa Madrigal, Nineth Mendoza y Antony Solorzano. El objetivo de este estudio es determinar la presencia del parásito *Trypanosoma cruzi* en la sangre de los perros y en chinches de la comunidad de Getsemaní, para conocer la distribución de este parásito. *T. cruzi* es causante de la Enfermedad de Chagas en humanos, una enfermedad que se manifiesta con erupciones cutáneas y enfermedad cardiaca a largo plazo. El estudio se realizará en Getsemaní, porque se han encontrado casos clínicos en sus habitantes. Además se pretende determinar la presencia de la bacteria *Chlamydia psittaci* en aves, ya que se transmite al ser humano y puede causar enfermedad. Conocer la situación actual de tripanosomiasis y clamidiosis aviar dentro de la comunidad ayudará a implementar, en conjunto con el personal de salud, un sistema de vigilancia epidemiológico para la prevención y control de la transmisión de la enfermedad.

B. ¿QUÉ SE HARÁ?:

Si usted acepta participar voluntariamente en este estudio, se le harán visitas periódicas a su domicilio para realizar las siguientes actividades:

- 1- Se le aplicará un **cuestionario** donde deberá responder preguntas generales relacionadas con el estado físico de la vivienda, las características de las áreas alrededor de la vivienda, la tenencia de animales domésticos y silvestres y

conocimientos acerca de enfermedades transmitidas por vectores (chinchas, garrapatas, pulgas, mosquitos).

- 2- Se **inspeccionarán las áreas dentro de la casa y alrededor de la casa** para buscar chinchas (triatominos). Todos los chinchas que se encuentren se recolectarán con pinzas y se colocarán en frascos plásticos.
- 3- En el caso que posea perros, se les tomará una **muestra de sangre a cada perro** en dos tubitos (rojo y morado) por punción de una vena en sus patas delanteras o traseras. En perros muy pequeños se tomará la muestra de sangre del cuello. Se seguirán los procedimientos de sujeción y toma de la muestra aprobadas por la Comisión de Bienestar Animal, para que su mascota sienta el mínimo dolor posible, y no se incomode más de lo deseable. En el caso excepcional de que se presentara algún problema de salud en la mascota debido a la toma de muestra de sangre, el tratamiento y su costo estará a cargo de la Escuela de Medicina Veterinaria.
- 4- En el caso de que sean aves, se tomarán un **hisopado de la boca y uno de la cloaca de cada ave**. En cada caso se usará un diminuto hisopo metálico de algodón estéril. Se seguirán los procedimientos de sujeción y toma de la muestra según aprobado por la Comisión de Bienestar Animal. En el caso excepcional de que se presentara algún problema de salud en la mascota debido a la toma de hisopados, el tratamiento y su costo estará a cargo de la Escuela de Medicina Veterinaria .
- 5- Los perros que resulten **sin el parásito en la sangre**, participarán en un estudio durante 18 meses. Cada tres meses, los investigadores tomarán una muestra de sangre en dos tubitos de estos perros, para determinar si el perro tiene o no el parásito en la sangre. Si el perro lo llega a tener, ya no se volvería a sangrar. Si el perro no lo llega a tener, se tomaría la muestra de sangre 6 veces en esos 18 meses. En caso de que durante el estudio de 18 meses nazcan perros o ingresen perros nuevos al hogar, éstos se incluirían en el estudio.
- 6- ¿Autoriza Ud. a los investigadores a cumplir los rubros anteriores según sea el caso?

Sí _____ No _____
- 7- La información que cada participante aporte en los cuestionarios solo la manejarán los investigadores del proyecto. A cada participante se le dará un reporte con los resultados de su mascota, y los investigadores generarán una copia de los mismos para el análisis estadístico de los datos. Una vez concluida la investigación, los cuestionarios, los resultados de laboratorio y los consentimientos informados se digitalizarán con el fin de contar con un expediente para cada participante. Dichos datos se guardarán en un disco compacto, que estará en poder de los investigadores del proyecto, por tiempo indefinido.

C. RIESGOS:

Su participación en esta investigación no representa **ningún riesgo** para la salud de su mascota. Excepto por la molestia general de la punción para obtener la muestra de sangre, es posible que el animal se mueva, y la aguja salga de la vena, ocasionando un hematoma en el lugar de la punción. En el caso de las aves, por la molestia general de sujeción para obtener las muestras de la boca y la cloaca. Se usará **equipo estéril y desechable** para no poner en riesgo la salud de su mascota. Si durante el procedimiento usted considera que su mascota está siendo sujeta de algún grado de sufrimiento más allá de lo que usted considera permisible en ella, puede detener el procedimiento.

El muestreo entomológico tampoco representa ningún riesgo para su salud o la de su familia, ya que **se recolectarán todos los ejemplares de triatomas** que se encuentren en la casa y alrededor de la casa.

D. BENEFICIOS:

Como resultado de su participación en este estudio se determinará si su mascota se encuentra infectada con los agentes *Trypanosoma cruzi* o *Chlamydia psittaci*. También conocerá si en los espacios de su casa o alrededor de su casa se encuentran presentes chinches transmisores de la Enfermedad de Chagas. Además recibirá información sobre las enfermedades estudiadas, sobre enfermedades transmitidas por mosquitos, garrapatas, pulgas, entre otros vectores, así como información sobre el cuidado, la nutrición y la salud de las mascotas.

E. Antes de dar su autorización para este estudio usted debe haber hablado con alguno de los investigadores sobre este estudio y ellos deben haber contestado satisfactoriamente todas sus preguntas. Si quisiera más información más adelante, puede obtenerla llamando a la coordinadora principal, Dra. Gaby Dolz al teléfono 2562-4508 o 2562 4553, en horario de oficina, o al celular 8860-7865 en horas fuera de oficina y casos de emergencia.

F. Recibirá una copia de esta fórmula firmada para su uso personal.

G. Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene el derecho de negarse a participar o a discontinuar su participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención que requiere.

H. Su participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica, pero de una manera anónima.

I. No perderá ningún derecho legal por firmar este documento.

CONSENTIMIENTO

He leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio.

Nombre, cédula y firma del sujeto
fecha

Nombre, cédula y firma del testigo
fecha

Nombre, cédula y firma del Investigador que solicita el consentimiento
fecha

Anexo 3. Información a recolectar y ficha clínica a aplicar a cada canino que participará en el estudio en la comunidad de Getsemaní.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
COSTA RICA**

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



Distribución espacio-temporal del *Trypanosoma cruzi* en perros y chinchas en la comunidad de Getsemaní

Ficha Clínica

DATOS GENERALES				
Fecha:	Latitud:	Longitud:		
Código casa	Propietario:			
INFORMACION GENERAL DEL PACIENTE				
Código muestra:	Nombre:	Sexo:		
Edad:	Raza:	Esterilización: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		
Frecuencia cardiaca:	Sonidos cardiacos: Soplos <input type="checkbox"/> Normales <input type="checkbox"/>			
Frecuencia respiratoria:	Temperatura:			
Pelaje:	Opaco <input type="checkbox"/>	Quebradizo <input type="checkbox"/>	Alopecia <input type="checkbox"/>	Normal <input type="checkbox"/>
Piel:	Heridas <input type="checkbox"/>	Laceraciones <input type="checkbox"/>	Costras <input type="checkbox"/>	Ninguna <input type="checkbox"/>
Tiempo llenado capilar:	%	Deshidratación: Normal <input type="checkbox"/> Moderada <input type="checkbox"/> Severa <input type="checkbox"/>		
Membranas mucosas:	Normal <input type="checkbox"/>	Pálidas <input type="checkbox"/>	Cianóticas <input type="checkbox"/>	Ictéricas <input type="checkbox"/>
Estado linfonodos:	Tamaño: Normal <input type="checkbox"/> Aumentados <input type="checkbox"/>			
	Forma: Normal <input type="checkbox"/> Alterada <input type="checkbox"/>			
Estado nutricional:	Obeso <input type="checkbox"/>	Bueno <input type="checkbox"/>	Regular <input type="checkbox"/>	Caquéxico <input type="checkbox"/>
Presencia de ectoparásitos:	Piojos <input type="checkbox"/>	Pulgas <input type="checkbox"/>	Garrapatas <input type="checkbox"/>	Ninguna <input type="checkbox"/>
Actitud:	Deprimido <input type="checkbox"/>	Dócil <input type="checkbox"/>	Alerta <input type="checkbox"/>	Agresivo <input type="checkbox"/> Hiperactivo <input type="checkbox"/>
Total de muestras	T. Rojo		T. Morado	
Observaciones:				



Anexo 4. Alineamiento de las secuencias de las muestras de caninos y vectores positivos para *T. cruzi* de la comunidad de Getsemaní y la secuencia parcial de *T. cruzi* (LT220278) depositada en el GenBank.

```

LT220278.1          TGGGATAACAAAGGAGCAGCCTCTGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGGTTGGTTTTAAAGTC
Perro (control +)  -----AGCAGCCTCTGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGGTTGGTTTTAAAGTC
Perro (2)          -----AGCAGCCTCTGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGGTTGGTTTTAAAGTC
Chinche (casa 4)  -----AGCAGCCTCTGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGGTTGGTTTTAAAGTC
Chinche (casa 5)  -----AGCAGCCTCTGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGGTTGGTTTTAAAGTC
Chinche (casa7)   -----AGCAGCCTCTGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGGTTGGTTTTAAAGTC
Chinche (casa 22) -----AGCAGCCTCTGGGCCACCGTTTCGGCTTTTGGTTGGTTTTAAAGTC
                    *****

```

```

LT220278.1          CATTGGAGATTATGGGGCAGTGTGACAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCACACACACACGCA
Perro (control +)  CATTGGAGATTATGGGGCAGTGTGACAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCACACACACACGCA
Perro (2)          CATTGGAGATTATGGGGCAGTGTGACAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCACACACACACGCA
Chinche (casa 4)  CATTGGAGATTATGGGGCAGTGTGACAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCACACACACACGCA
Chinche (casa 5)  CATTGGAGATTATGGGGCAGTGTGACAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCACACACACACGCA
Chinche (casa7)   CATTGGAGATTATGGGGCAGTGTGACAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCACACACACACGCA
Chinche (casa 22) CATTGGAGATTATGGGGCAGTGTGACAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCACACACACACGCA
                    *****

```

```

LT220278.1          CACTCCTTTTTGGATGTTGTGTCTTCTGTGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAA
Perro (control +)  CACTCCTTTTTGGATGTTGTGTCTTCTGTGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAA
Perro (2)          CACTCCTTTTTGGATGTTGTGTCTTCTGTGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAA
Chinche (casa 4)  CACTCCTTTTTGGATGTTGTGTCTTCTGTGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAA
Chinche (casa 5)  CACTCCTTTTTGGATGTTGTGTCTTCTGTGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAA
Chinche (casa 7)  CACTCCTTTTTGGATGTTGTGTCTTCTGTGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAA
Chinche (casa 22) CACTCCTTTTTGGATGTTGTGTCTTCTGTGTGTGTGGCACTCGTCGCCTTTGTGGGAAA
                    *****

```

```

LT220278.1          TCCGTGTGGCACTTGTTTGGTGTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTTCACACATGTTTC
Perro (control +)  TCCGTGTGGCACTTGTTTGGTGTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTTCACACATGTTTC
Perro (2)          TCCGTGTGGCACTTGTTTGGTGTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTTCACACATGTTTC
Chinche (casa 4)  TCCGTGTGGCACTTGTTTGGTGTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTTCACACATGTTTC
Chinche (casa 5)  TCCGTGTGGCACTTGTTTGGTGTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTTCACACATGTTTC
Chinche (casa 7)  TCCGTGTGGCACTTGTTTGGTGTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTTCACACATGTTTC
Chinche (casa 22) TCCGTGTGGCACTTGTTTGGTGTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTTCACACATGTTTC
                    *****

```

```

LT220278.1          ACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGG
Perro (control +)  ACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGG
Perro (2)          ACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGG
Chinche (casa 4)  ACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGG
Chinche (casa 5)  ACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGG
Chinche (casa 7)  ACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGG
Chinche (casa 22) ACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGGAGGGTAGTTCGGGG
                    *****

```

```

LT220278.1          GAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCG
Perro (control +)  GAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCG
Perro (2)          GAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCG
Chinche (casa 4)  GAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCG
Chinche (casa 5)  GAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCG
Chinche (casa 7)  GAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCG
Chinche (casa 22) GAGAACGTACTGGTGCCTCAGAGGTGAAATTCCTTAGACCGCACCAAGACGAACTACAGCG
                    *****

```

```

LT220278.1          AAGGCATTCCTCAAGGATACCTTCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGA
Perro (control +)  AAGGCATTCCTCAAGGATACCTTCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGA
Perro (2)          AAGGCATTCCTCAAGGATACCTTCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGA
Chinche (casa 4)  AAGGCATTCCTCAAGGATACCTTCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGA
Chinche (casa 5)  AAGGCATTCCTCAAGGATACCTTCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGA
Chinche (casa 7)  AAGGCATTCCTCAAGGATACCTTCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGA
Chinche (casa 22) AAGGCATTCCTCAAGGATACCTTCTCAATCAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGA
                    *****

```

```

LT220278.1      TTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGG
Perro (control +) TTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGG
Perro (2)       TTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGG
Chinche (casa 4) TTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGG
Chinche (casa 5) TTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGG
Chinche (casa7) TTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGG
Chinche (casa 22) TTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGG
*****

LT220278.1      TCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGATTATATATATTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATG
Perro (control +) TCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGATTATATATATTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATG
Perro (2)       TCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGATTATATATATTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATG
Chinche (casa 4) TCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGATTATATATATTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATG
Chinche (casa 5) TCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGATTATATATATTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATG
Chinche (casa7) TCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGATTATATATATTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATG
Chinche (casa 22) TCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGATTATATATATTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATG
*****

LT220278.1      AATATATTAATTTACGTGCATATTCCTTTTTGGTCTTCGTTTTTTTTACGGCGAGGACCT
Perro (control +) AATATATTAATTTACGTGCATATTCCTTTTTGGTCTTCGTTTTTTTTACGGCGAGGACCT
Perro (2)       AATATATTAATTTACGTGCATATTCCTTTTTGGTCTTCGTTTTTTTTACGGCGAGGACCT
Chinche (casa 4) AATATATTAATTTACGTGCATATTCCTTTTTGGTCTTCGTTTTTTTTACGGCGAGGACCT
Chinche (casa 5) AATATATTAATTTACGTGCATATTCCTTTTTGGTCTTCGTTTTTTTTACGGCGAGGACCT
Chinche (casa7) AATATATTAATTTACGTGCATATTCCTTTTTGGTCTTCGTTTTTTTTACGGCGAGGACCT
Chinche (casa 22) AATATATTAATTTACGTGCATATTCCTTTTTGGTCTTCGTTTTTTTTACGGCGAGGACCT
*****

LT220278.1      TTAACGGGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTGAGGTTACA
Perro (control +) TTAACGGGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTG-----
Perro (2)       TTAACGGGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTG-----
Chinche (casa 4) TTAACGGGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTG-----
Chinche (casa 5) TTAACGGGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTG-----
Chinche (casa 7) TTAACGGGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTG-----
Chinche (casa23) TTAACGGGAATATCCTCAGCACGTTATCTGACTTCTTCACGCGAAAGCTTTG-----
*****

LT220278.1      GTCTCAG
Perro (control +) -----
Perro (2)       -----
Chinche (casa 4) -----
Chinche (casa 5) -----
Chinche (casa 7) -----
Chinche (casa 22) -----

```