



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**PRESENCIA DE *Trypanosoma cruzi* EN
CANINOS DE LA COMUNA DE TIL-TIL, REGIÓN
METROPOLITANA**

Génesis Valentina Larrondo Valderrama

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: DR. PEDRO CATTAN AYALA

Financiamiento Proyecto FONDECYT 1140650

SANTIAGO, CHILE

2017

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Alfredo y Roxana, por el apoyo incondicional en cada camino que he decidido elegir, por confiar en mí y nunca presionarme, gracias por su infinito amor y compañía siempre.

A Williams Espinoza por ser el mejor compañero, por la sabiduría y tranquilidad entregada día a día. Por enseñarme que nada es tan terrible y creer siempre en mí. Gracias por todo amor.

A Antonella Bacigalupo por todas las correcciones y el tiempo que dedicó a resolver todas mis dudas.

Al Dr. Cattan por su buena disposición, corrección y guía en el desarrollo de esta tesis.

A mis profesores y consejeros, gracias por el tiempo, enseñanza y comprensión.

A mis amigos que me impulsaron de una u otra forma a seguir y a creer en mis capacidades. El apoyo constante, entendimiento y buena energía en todo momento. Con el tiempo he tenido la fortuna de tener a los mejores.

A Patricia Jury, Juan Osvaldo, Solange Urrutia y Valeria Pérez, gracias por su ayuda en todo lo que necesité y así poder seguir adelante con este trabajo. Gracias amigos.

ÍNDICE

Página	
Resumen	I
Summary	II
Lista de Figuras, tablas	III
Introducción	1
Revisión Bibliográfica	2
Objetivo General	6
Objetivos Específicos	6
Material y Métodos	7
1- Área de estudio	7
2- Toma de muestra	8
3- Análisis de laboratorio de las muestras	8
4- Análisis estadístico	10
Resultados	11
Discusión	16
Conclusiones	22
Bibliografía	23
Anexos	30

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis de interés en salud pública que se encuentra distribuida ampliamente en América, causada por *Trypanosoma cruzi*, protozoo que es transmitido principalmente a través de las deyecciones de insectos hematófagos de la subfamilia Reduviidae. Los caninos, al ser mamíferos domésticos de gran cercanía con el ser humano, son un reservorio de esta enfermedad. El presente estudio tuvo como objetivo principal determinar la presencia de *T. cruzi* en caninos de la comuna de Til-Til, Región Metropolitana, a través del método de diagnóstico molecular PCR. Se estudiaron 90 caninos, 30 animales por cada localidad de la comuna en zona endémica (Huechún, Rungue, Til-Til). Se llevó a cabo una encuesta para cada dueño de los animales estudiados para determinar posibles factores de riesgos asociados. El análisis estadístico se realizó a través del test exacto de Fisher para determinar la frecuencia de infección entre localidades y una Regresión logística para analizar los factores de riesgo relacionados con los animales positivos. Se encontró prevalencia del 16,3% en la comuna, un total de 14 caninos analizados por la reacción en cadena de la polimerasa fueron positivos a *T. cruzi*, utilizando los primers 121 y 122. Rungue presentó una prevalencia de 10,7%, con 3 animales positivos, Huechún 21,4% con 6 animales positivos y Til-Til una prevalencia del 16,7% con 5 positivos a *T. cruzi*. No se encontraron diferencias significativas entre localidades (Fisher, $p= 0,583$). En la regresión múltiple no se encontró asociación significativa entre la condición de ser positivo a *T. cruzi* con ninguno de los factores de riesgos determinados en las encuestas realizadas. Este trabajo, sobre prevalencia de perros infectados con *T. cruzi* en Chile, revela la importancia epidemiológica de estos animales como reservorios del protozoo para los habitantes de la comuna de Til-Til y la diseminación del agente en los triatomíneos del sector.

Palabras Claves: Enfermedad de Chagas, prevalencia, caninos, reservorio, *Trypanosoma cruzi*, infección.

SUMMARY

Chagas disease is a zoonosis of interest in public health that is widely distributed in America. This disease is caused by *Trypanosoma cruzi*, a protozoan that is transmitted mainly through the dejections of hematophagous insect of the subfamily Reduviidae. The canines, being domestic mammals close to the human being, are a reservoir of this disease. This study had as main objective to determine the presence of *T. cruzi* in the canines of the Til –Til commune, Metropolitan Region, through the PCR molecular diagnostic method. A total of 90 canines, 30 animals for each locality of the commune, one area (Huechún, Rungue, Til-Til) were studied. A survey was conducted for each owner of the animals studied and identified the possible risk factors associated.

Statistical analysis was performed using the Fisher exact test to determine the frequency of infection between sites and a logistic regression to analyze risk factors related to positive animals. A prevalence of 16.3% was found in the commune, a total of 14 canines analyzed by the polymerase chain reaction were positive to *T. cruzi*, using primers 121 and 122. Rungue presented a prevalence of 10.7% with 3 positive animals, Huechún 21.4% with 6 positive animals and Til-Til a prevalence of 16.7% with 5 positive to *T. cruzi*. No significant differences were founded between localities (Fisher, $p = 0.583$).

In the multiple regressions there was no significant association between the conditions of being positive to *T. cruzi* with any of the risk factors determined in the surveys.

This work about prevalence of dogs infected with *T. cruzi* in Chile reveals the epidemiological importance of these animals as reservoirs of the protozoan for the inhabitants of the commune of Til-Til and the dissemination of the agent in the triatomines of the sector.

Key words: Chagas' disease, prevalence, canines, reservoir, *Trypanosoma cruzi*, infection.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.

Figuras	Página
Figura 1: Estatus de infección por <i>T. cruzi</i> en caninos de la comuna de Til-Til	11
Figura 2: Estatus de infección por <i>T. cruzi</i> en caninos por Localidad	12
Figura 3: Gel agarosa al 2%. Carril 1: control negativo; carril 2: Ladder; carril 3: control positivo; carril 4, 5, 6, y 7 muestras positivas. Carril 8 y 9 muestras negativas.	13

Tablas	Página
Tabla 1: Prevalencia a <i>T. cruzi</i> en caninos por localidad en la comuna de Til-Til.	13
Tabla 2: Resultados regresión simple de variables explicativas sugestivas.	14
Tabla 3: Resultados regresión múltiple.	15

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi es un parásito que infecta tanto a seres humanos como a animales domésticos y silvestres, constituyéndose en una zoonosis para los humanos, denominada enfermedad de Chagas. Esta enfermedad tiene diversas vías de transmisión, siendo una de las más importantes la vía vectorial, la cual se produce a través de la contaminación con deyecciones depositadas por insectos hematófagos infectados por este parásito, cuando pican a un hospedero (Arriaza y Orellana, 2010). Estos insectos son hemípteros de la subfamilia Triatominae y se conocen en Chile como vinchucas (Acuña, 2002).

Esta enfermedad se encuentra en América hace más de 9000 años, extendiéndose desde el sur de Estados Unidos de Norteamérica, hasta el centro de Chile y sur de Argentina, estimándose una población de 6 a 7 millones de personas infectadas (WHO, 2015) y entre 75 a 90 millones que están expuestos a contraerla (Toso *et al.*, 2011).

La enfermedad de Chagas en Chile presentó una tasa de incidencia de tres por cada 100 mil habitantes entre los años 1990 y 2008. En el año 2009 presentó un marcado ascenso, probablemente debido a una mayor pesquisa, llegando a 11,1 por cada 100 mil habitantes en el año 2011 (MINSAL, 2014). Se estima que en el país hay 142.000 personas infectadas con *T. cruzi* (Toso *et al.*, 2011).

Por otra parte, más de 150 especies de mamíferos silvestres se encuentran naturalmente infectados con *T. cruzi*, y algunos reservorios poseen un papel importante en el mantenimiento de los ciclos de interacción doméstica, peridoméstica y silvestre en la enfermedad de Chagas (Rozas *et al.*, 2005).

Estudios realizados en Argentina han demostrado la importancia del perro como reservorio intradomiciliario, donde se ha informado un 41% de perros infectados por *T. cruzi*. El hallazgo de perros infectados es de importancia epidemiológica por su cercanía al hombre y además por la posibilidad de que los triatominos se alimenten de estos hospedadores (Reyes *et al.*, 2002), infectándose y multiplicando al parásito.

En este trabajo se expondrá la presencia de la Enfermedad de Chagas en perros de la comuna de Til-Til en la Región Metropolitana.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por *Trypanosoma cruzi*, parásito protozoario unicelular flagelado que forma parte del Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae. Este organismo se caracteriza por la presencia de una única gran mitocondria que contiene hasta el 25% del ADN celular. El ADN kinetoplastídico de *Trypanosoma cruzi* representa el único ADN mitocondrial de estos protozoos, el que consiste en dos tipos de moléculas específicas: minicírculos y maxicírculos, que se encuentran unidos en una única gran red de ADN. Existen aproximadamente 20.000 minicírculos y 40 maxicírculos, los cuales se encuentran encargados de codificar ARN (Brusés *et al.*, 2004).

Trypanosoma cruzi posee un ciclo de vida que involucra diversos estadios morfológicos, dependiendo de la especie de hospedero en el que se encuentre (Bacigalupo *et al.*, 2012). En los insectos vectores, el flagelado se encuentra en forma de epimastigotes en el intestino medio, y en forma de tripomastigotes metacíclicos infectantes en el intestino posterior y en las heces, los cuales ingresan en el hospedero mamífero por medio de la contaminación con deyecciones de las membranas mucosas o de heridas. Es aquí donde los tripomastigotes infectan las células, transformándose en amastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria. Los amastigotes intracelulares se transforman en tripomastigotes, lisan la célula y se liberan al sistema circulatorio, pudiendo infectar otras células y establecer nuevos sitios de infección (CDC, 2013). Los insectos vectores se infectan cuando se alimentan de mamíferos infectados, y una vez dentro del vector, el tripanosomátido se multiplica y diferencia en el tracto digestivo, completándose así el ciclo del parásito (Bacigalupo *et al.*, 2012).

Existen tres ciclos básicos en la transmisión de *T. cruzi*, los cuales están interrelacionados. En el ciclo silvestre, el parásito realiza su ciclo entre especies de mamíferos silvestres y triatomíneos silvestres. En el ciclo de transmisión doméstico, los insectos vectores se encuentran en las viviendas, lo que ocasiona la transmisión entre humanos y triatomíneos. El tercer ciclo involucra animales domésticos y vectores, denominado ciclo peridoméstico, el que puede involucrar a seres humanos (Rovid, 2010).

El desarrollo de los triatominos consta de huevo, cinco estadios ninfales y estadio adulto, y requiere sangre de vertebrados para completar su ciclo de vida (Bacigalupo *et al.*, 2012).

En Chile se conocen 4 especies de triatominos; *Triatoma infestans*, *Mepraiaspinolai*, *Mepraia gajardoi* y *Mepraia parapatrica*, que ocupan distintos ecotopos tanto silvestres como peridomésticos (ISPCH, 2012). En el ciclo doméstico, el principal vector de la enfermedad de Chagas en humanos en Chile es *T. infestans*. Este vector ha sido reducido exhaustivamente por medio de la fumigación de viviendas en las zonas endémicas de acuerdo a la Iniciativa del Cono Sur para su eliminación (Rozas *et al.*, 2005). *Triatoma infestans* y *M. spinolai* se encuentran en la zona central de nuestro país (ISPCH, 2012). *T. infestans* ha sido asociada a viviendas rurales, particularmente aquellas de adobe y paja, pero se ha encontrado en condiciones silvestres, en intersticio de paredes de piedra, entre o bajo rocas, pircas y chaguales. Por otro lado, *M. spinolai*, que se caracteriza como una especie silvestre, ha sido encontrada en piedras, en grieta de rocas, en sitios de descanso de diferentes mamíferos, como zorros, conejos, liebres, vizcachas, otros marsupiales y en corrales (Bacigalupo *et al.*, 2006).

En el ciclo doméstico, los mamíferos de pequeño y mediano tamaño constituyen los reservorios más importantes en esta enfermedad. Los carnívoros *Canis lupus familiaris* y *Felis catus* tienen tasas de infección natural que varían según el área endémica, desde un 0 a un 60%. Los habitantes de zonas endémicas tienen varios perros, los que a veces duermen en el interior de las viviendas durante la noche, lo que conlleva altas posibilidades de infección al hombre. Por otro lado, existen algunos roedores domésticos que al encontrarse infectados, pueden ser ingeridos por mamíferos mayores, lo que resulta importante, ya que la vía digestiva constituye otra forma en que los caninos se pueden infectar (Graiff, 2010).

Existen tres grupos de métodos principales de diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en mamíferos: parasitológicos, serológicos y moleculares. El diagnóstico parasitológico determina la presencia de *T. cruzi* en la sangre del paciente, cultivando la sangre (hemocultivo) o bien usando vectores no infectados, alimentados con la sangre del paciente para buscar al parásito en las deyecciones del insecto (xenodiagnóstico). El diagnóstico se realiza tradicionalmente por métodos serológicos, determinando la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi*, lo que no siempre es concluyente. La reacción en cadena de la polimerasa

(PCR), es una herramienta molecular que permite amplificar secuencias de ADN del parásito con alta especificidad y sensibilidad, siendo una herramienta útil en caso de serología dudosa (Martínez *et al.*, 2013). Las técnicas moleculares consisten en extraer el ADN total de la muestra sangre de mamíferos y realizar la PCR con iniciadores específicos para amplificar una región del ADN del protozoo. Mediante este procedimiento se pueden amplificar secuencias del ADN nuclear de *T. cruzi* o bien secuencias del ADN presentes en el kinetoplasto, estructura en la que hay mayor sensibilidad de amplificación, permitiendo la detección de hasta un parásito en 100 ml de sangre (0.005 parásitos/ml)³ (Martínez *et al.*, 2013).

En la medida que avanzan los planes de control de triatomíneos domiciliarios, disminuye progresivamente la tasa de infección natural por *T. cruzi* en perros y gatos, considerándoseles centinelas de esta enfermedad (Graiff, 2010).

Hay estudios que indican que algunos triatomíneos preferirían alimentarse de sangre canina, pues se ha encontrado que la tasa de infección de *T. infestans* cuya fuente de alimentación de perros fue de un 49%, versus el 39% de los *T. infestans* que se habían alimentado de gatos; el 38% que consumieron sangre humana; y el 28% que se alimentaron de gallinas. Es por esto que los caninos son epidemiológicamente importantes como fuente de infección para los triatomíneos (Gürtler *et al.*, 2007).

En Chile, el estudio de mamíferos domésticos y la enfermedad de Chagas se han llevado a cabo a través de diversos métodos. Entre 1939 y 1959 la prevalencia del parásito en caninos se estudió a través de xenodiagnóstico arrojando un 9,1% de positivos en el país (Neghme y Schenone, 1960). En 1983, el análisis se realizó a través del método de reacción de hemoaglutinación indirecta, arrojando un 7% de perros positivos en sectores rurales de la región de Valparaíso (Flores *et al.*, 1984). En el 2008, se estudiaron caninos en las comunas de Calera de Tango y Til-Til mediante el método de hemoaglutinación indirecta, obteniendo un 7,4% de positivos en la comuna de Til-Til (Uribe, 2008).

También es importante considerar desde el punto de vista médico-veterinario que la tripanosomiasis puede causar diversas alteraciones patológicas en perros, tanto alteraciones cardíacas, que han sido demostradas por disturbios en la conducción y arritmias

ventriculares y supraventriculares, así como signos propios secundarios a esta condición tales como ascitis, estrés respiratorio, efusión torácica y cianosis (Reyes *et al.*, 2002).

Con estos antecedentes, en esta memoria de título se hará un estudio de la situación actual del agente de la enfermedad de Chagas en caninos de la comuna de Til-Til, considerando tres localidades diferentes desde los puntos de vista urbano y geográfico. El objetivo es conocer la frecuencia de presentación de la infección a través de un método de diagnóstico sensible (PCR) para aportar un antecedente actualizado del problema en un sector de la Región Metropolitana donde está confirmada la presencia de ambos vectores que transmiten esta zoonosis. Es importante el estudio de caninos dado el contacto cercano con las personas, su caracterización como parte del reservorio de la enfermedad y el riesgo de transmisión de ésta (Reyes *et al.*, 2002).

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Trypanosoma cruzi* en caninos de la comuna de Til-Til, Región Metropolitana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la frecuencia de infección por *T. cruzi* en caninos de tres localidades de la comuna de Til-Til.
2. Comparar la frecuencia de infección entre localidades.
3. Analizar los posibles factores de riesgo de infección por *T. cruzi* en los caninos de la comuna.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en tres localidades de la zona norte de la Región Metropolitana; Rungue ($32^{\circ}9'S-70^{\circ}9'O$), Huechún ($33^{\circ}05'S-70^{\circ}81'O$) y Til-Til ($33^{\circ}4'S-70^{\circ}55'O$) pertenecientes a la provincia de Chacabuco. Rungue es una localidad rural que cuenta con una población de 800 habitantes, ubicado a orillas del embalse Rungue, en el kilómetro 54 de la ruta 5 norte. Huechún cuenta con una población estimada de 1800 habitantes, localidad que conserva su entorno rural debido a la gran cantidad de parcelas agrícolas y caminos interiores no pavimentados. En Til-Til la población aproximada es de 14.755 habitantes. Fue una comuna minera y hoy en día se extrae principalmente piedra caliza y áridos (BCN, 2012). Estas tres localidades se ubican en el área endémica del país.

Hay estudios que indican presencia de triatomíneos positivos a *T. cruzi* en sectores de la localidad de Til-Til, en donde las viviendas tienden a ser precarias y ubicadas en cerros que mantienen su vegetación y fauna autóctona, donde ejemplares de triatomíneos se encuentran presentes (Uribe, 2008).

Considerando una prevalencia del 10 %, la que se obtuvo a partir de un promedio de los estudios previos en cuanto a la prevalencia de la enfermedad en caninos en la zona, un nivel de confianza del 95% y una potencia del 90%, el tamaño muestral requerido fue de 87 muestras, que se concretizó por un muestreo de 90 caninos en total sobre el año de edad. Se consideraron 30 animales por localidad, los cuales fueron elegidos según la disposición de sus propietarios para acceder a la toma de muestra de su mascota y a responder la encuesta necesaria para determinar factores de riesgo.

Se requirió de un consentimiento previo – en la forma de un consentimiento informado - que permitió la autorización de la toma de muestra de los caninos y el uso de la información obtenida (Anexo 1).

Para efectos de conocer los factores de riesgo, se diseñó una encuesta que incluyó preguntas que abarcaron datos familiares, información y registro de los animales que poseían, sus características y aspectos demográficos. También se hicieron preguntas

respecto al cuidado de éstos, su origen y sus características en cuanto a sus hábitos de desplazamiento. Por otro lado, se realizaron preguntas sobre la vivienda (características de la casa y peridomicilio) y costumbres que tenían dentro del hogar, el manejo que hacían frente a plagas e información sobre animales silvestres. También se hicieron preguntas sobre el conocimiento que tenía el encuestado respecto de la Enfermedad de Chagas, incluyendo si eran capaces de identificar al vector, sus estadios, lugares de avistamiento y si se había verificado la existencia de contacto de vinchucas con sus animales (Anexo 2). Para efectos del presente trabajo se consideraron aquellas variables que podrían estar directamente relacionadas con la presencia de caninos positivos.

Toma de muestra

El procedimiento de obtención de muestra fue de sangre venosa periférica de los miembros anteriores. Se sujetaron los caninos en decúbito esternal y se llevó a cabo la preparación aséptica con alcohol 70% de la región dorsal del tercio medio distal del radio y ulna, que es la zona que se puncionó. Para interrumpir el retorno venoso, se usó una ligadura tensada con una pinza hemostática durante unos segundos antes de la venopunción. Este procedimiento se realizó con jeringa, introduciendo la aguja con bisel hacia arriba en un ángulo de 45° en la vena cefálica, que se encontraba resaltada por presión. Una vez que se atravesó la pared del vaso sanguíneo, se llevó a cabo una ligera aspiración del émbolo para verificar que la aguja se encontrara en vaso sanguíneo, caso en el que se tomó la muestra. Se depositaron 0,5 ml de la muestra en un tubo eppendorf, y se mezcló con una solución de 6 M Guanidina-HCL y 200 mM EDTA en proporción de 1:1.

Análisis de laboratorio de las muestras

Para la obtención del ADN de las muestras de sangre de los caninos, se utilizó el kit Quick g-ADN™ BloodMiniPrep. Se utilizaron 100 µl de sangre. La cuantificación del ADN extraído se realizó en un fluorómetro Qubit 3.0 utilizando 1 µl de muestra y 199 µl de solución del kit para ADN de doble hebra de alta sensibilidad (Invitrogen, Life Technologies).

Se agregaron 5 µl del eluido obtenido tubos individuales de PCR para su amplificación, los cuales contenían un Master Mix que incluía: 0,12 µl de cada uno de los

desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) a una concentración de 0,4 mM respectivamente; 0,26 µl de Taq ADN Polymerase™ a 0,5 Unidades/reacción; 3,2 µl del amortiguador de pH de la enzima al 1X, la cual contenía MgCl₂ a una concentración de 2 mM ; 0,75 µl de MgCl₂ a una concentración de 50 mM, 1,28 µl de cada partidor a una concentración de 0,42 mM; 121 (AAATAATGTACGGGGGAGATGCATGA) y 122 (GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA) - estos partidores se unen a las regiones conservadas CSB2 y CSB3 de los minicírculos del ADN kinetoplastídico, respectivamente, gatillando la amplificación de la región hipervariable, generando un fragmento de 330 pares de bases (Wincker et al., 1994) -; y finalmente se agregaron 19,75 µl de agua bidestilada libre de nucleasas, para un volumen final de 27 µl de Master Mix.

Los tubos de PCR fueron colocados en un termociclador (Life Express Termal Cycler, Modelo: TC96/G/H (b)), sometiéndose a: un ciclo de 98°C/ 1 min.; un ciclo de 64°C/ 2 min.; 33 ciclos de 94°C/ 1 min. y 64 °C/ 1 min.; y un último ciclo de 72°C/ 10 min. Se utilizó agua bidestilada libre de nucleasas como control negativo y ADN de la cepa Tulahuén como control positivo.

Luego, 10 µl de cada producto amplificado se cargaron en geles de agarosa TBE (Tris/Borate/EDTA) al 2% teñido con Gel Red Nucleic AcidStain 0,1 µl/ml embebido en buffer TBE 1X, siendo sometidos a electroforesis por 45 minutos a 100 Volts. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb en cada corrida. Para evidenciar la presencia de la banda de 330 pb, el gel de corrida se observó en un transiluminador UV y cada revelado se fotografió. Las muestras se amplificaron en triplicado.

Análisis estadístico

Para resolver el objetivo 1, se utilizó frecuencia relativa, análisis que consiste en el cociente de la frecuencia absoluta de un determinado valor y el número total de datos, obteniendo así la frecuencia de infección en la comuna.

Para resolver el objetivo 2, se utilizó el Test exacto de Fisher, prueba de significación estadística que permite analizar cuando dos variables o más están asociadas y la muestra a estudiar es demasiado pequeña para analizar con χ^2 . Las condiciones de χ^2 exigen que los valores de las celdas en una tabla de contingencia sean mayores de 5. Así, en una tabla 2x2 será necesario que todas las celdas verifiquen esta condición. (Díaz y Fernández, 2004).

Para resolver el objetivo 3, se utilizó una regresión logística. Este modelo estadístico permite cuantificar la importancia de la relación existente entre cada una de las covariables respecto a la variable dependiente y así modelar como influye la aparición de un suceso, prediciendo la probabilidad de ocurrencia. Deben incluirse todas aquellas variables que se consideren importantes para el modelo, con un análisis univariado previo que demuestre una relación suficiente con la variable dependiente (SQCE, 2007).

RESULTADOS

Resolución del objetivo 1

Se determinó la frecuencia de *T. cruzi* en la muestra de caninos de la comuna de Til-Til a través del cociente entre el número de individuos parasitados y el total de individuos muestreados por localidad y en total. Mediante la técnica de PCR convencional se detectaron 14 caninos positivos en las muestras analizadas, lo que corresponde a un 16,3% de los animales muestreados (Figura 1). Se analizaron 86 muestras finalmente, ya que 4 de ellas, dos pertenecientes a la localidad de Huechún y dos a la localidad Rungue, no pudieron ser procesadas por alteración de la muestra.

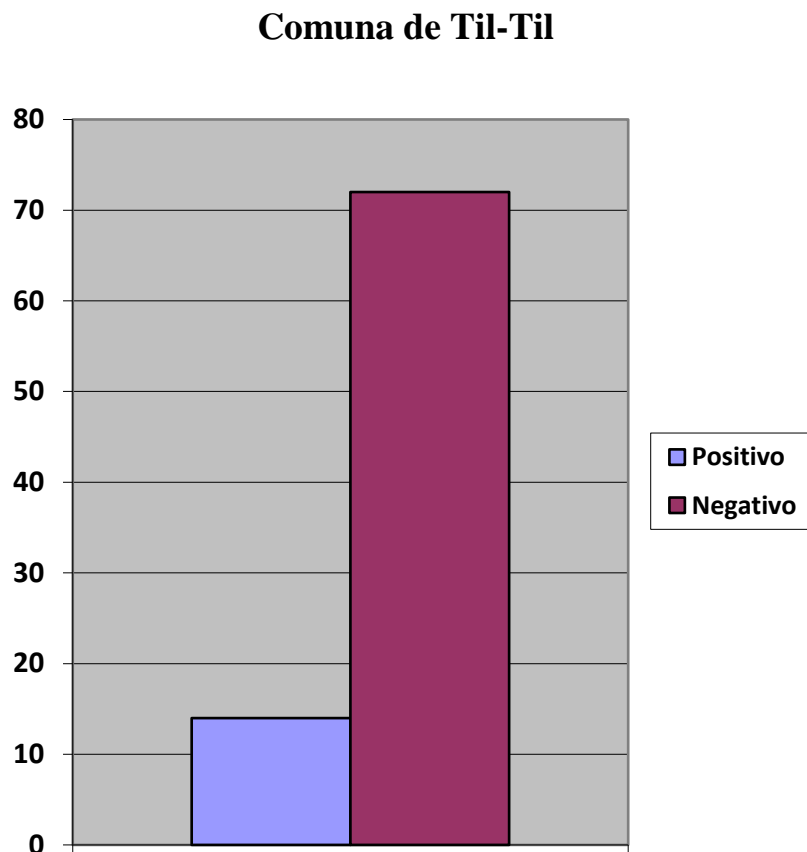


Figura 1: Estatus de infección por *T. cruzi* en caninos de la comuna de Til-Til

Localidades

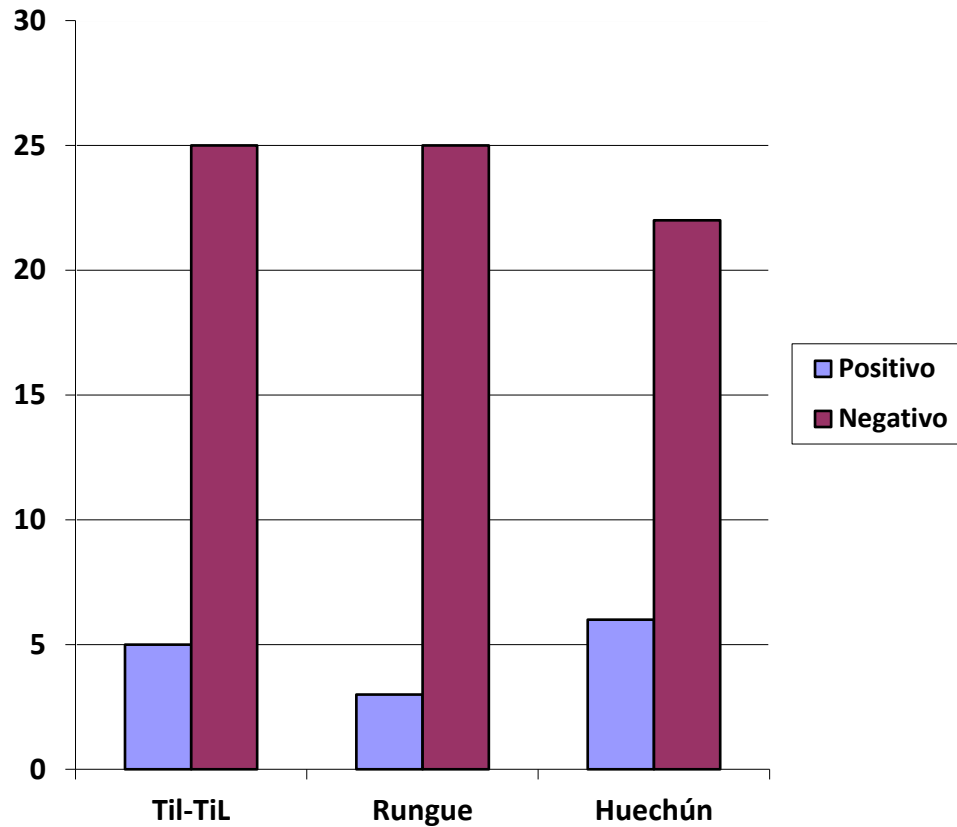


Figura 2: Estatus de infección por *T. cruzi* en caninos por Localidad

Al separar los resultados por localidad se observó que los caninos positivos fluctuaron entre 3 y 6 animales, como se observa en la Figura 2. En la localidad de Rungue, los caninos analizados fueron 28, de los cuales 3 se detectaron como positivos, siendo un 10,7% la positividad en la localidad. En Til-Til, 30 animales fueron analizados encontrándose 5 de ellos positivos, correspondiendo a un 16,7%. En la localidad de Huechún, 28 caninos fueron analizados, siendo 6 de ellos positivos a Chagas, con un 21,4% de positividad dentro de la localidad.

En la Figura 3 se observan los resultados para 4 muestras positivas bajo el gel agarosa al 2%. Se observa claramente la banda de 330 pares de bases para leer positiva la muestra.

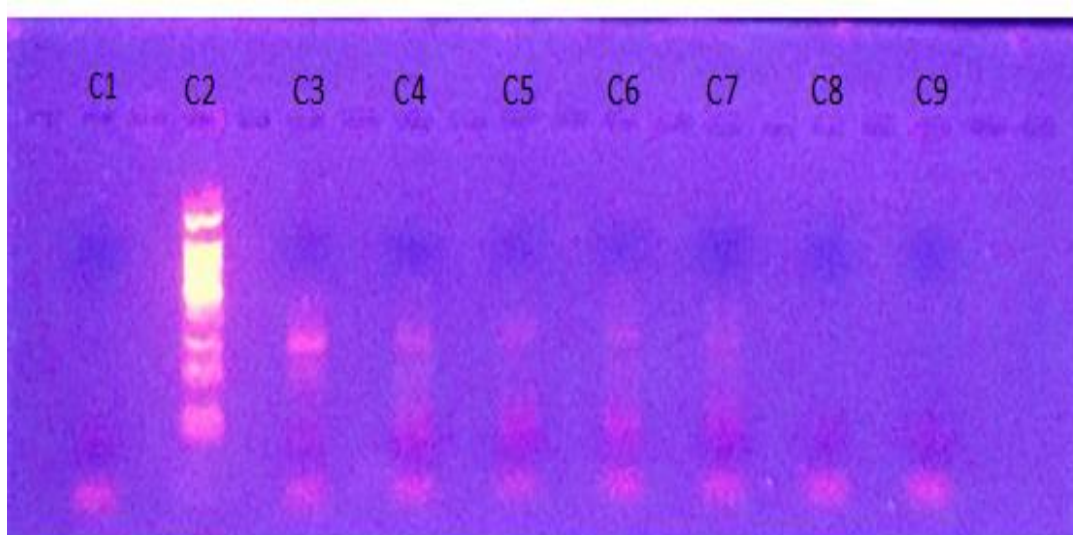


Figura 3: Gel Agarosa 2%. Carril 1: control negativo; carril 2: Ladder; carril 3: control positivo; carril 4, 5, 6, y 7 muestras positivas. Carril 8 y 9 muestras negativas.

Resolución del objetivo 2

Tabla 1: Prevalencia a *T. cruzi* en caninos por localidad en la comuna de Til-Til.

Estatus	Til-Til	Huechún	Rungue
Infectado	5	6	3
No infectado	25	22	25

Como se observa en la Tabla 1, no hubo diferencias en el número de caninos infectados por localidad (Fisher, $p=0,583$).

Resolución del objetivo 3

Con el fin de determinar si la condición de ser positivo a *T. cruzi* en caninos estaba relacionada con los factores de riesgo determinados en las encuestas, se realizó un modelo de regresión logística, mediante el programa estadístico Infostat®.

Como variable respuesta se ocupó el número de animales positivos del estudio y como variables predictivas, aquellas obtenidas de la encuesta que estaban mayormente relacionadas con la presencia de caninos en cada lugar. Se efectuaron modelos de regresión logística simple para cada variable explicativa en estudio, en base a las tablas de frecuencia para cada una ellas (Peduzzi et al., 1996).

En el programa se analizó el posible efecto de las variables explicativas, en donde se consideraron variables sugestivas ($p < 0,25$) y significativas ($p < 0,05$) para incluirlas en el modelo de regresión logística.

Tabla regresión simple

La regresión logística simple realizada tuvo cinco variables sugestivas significativas para ingresarlas en el modelo de regresión múltiple, que se anotan en la Tabla 2

Tabla 2: Resultados regresión simple de variables explicativas sugestivas

Variable	p	Variable
Canino sale del recinto.	0,2315	Sugestiva
Canino tiene desparasitación externa	0,2027	Sugestiva

Casa de perro es de madera	0,2296	Sugestiva
Presencia de luminaria en el hogar	0,1227	Sugestiva
Acúmulo de escombros	0,1836	Sugestiva

En la regresión múltiple no se encontró asociación significativa entre la condición de ser positivo a *T. cruzi* con ninguno de los factores de riesgos determinados en las encuestas realizadas.

Tabla 3: Resultados regresión múltiple

Variable	P	Efecto de la variable
Canino sale del recinto.	0,1432	Sin efecto
Canino tiene desparasitación externa	0,4897	Sin efecto
Casa de perro es de madera	0,6762	Sin efecto
Presencia de luminaria en el hogar	0,2792	Sin efecto
Acúmulo de escombros	0,1130	Sin efecto

DISCUSIÓN

La presente estudio planteó como objetivo principal la pesquisa de caninos con infección chagásica en la comuna de Til-Til. La importancia de estos mamíferos domésticos como reservorio intradomiciliario, ha sido descrita en diversas publicaciones (Gürtler et al., 1998; Reyes *et al.*, 2002).

Luego de la obtención de muestras y análisis de PCR en laboratorio se obtuvieron 14 caninos positivos a la presencia de *T. cruzi*. Desde hace algunos años, la técnica de PCR ha sido introducida no solamente para reconocer la presencia de *T. cruzi* en diversos hospederos vertebrados, sino también caracterizar las cepas circulantes abriendo nueva perspectivas de investigación. Numerosos estudios realizados en la última década han evidenciado que la técnica de PCR en muestras de sangre de individuos infectados posee mayor sensibilidad en relación a otras técnicas de diagnóstico parasitológicas, tales como Xenodiagnóstico y hemocultivo (Rocha, 2006). Sin embargo la sensibilidad puede variar como lo ha demostrado Junqueira *et al* (1996) en seres humanos con fluctuaciones entre 59 y 100%. Es decir, existirían variaciones de los niveles de parasitemia detectados por PCR que dependerían de diversos factores, entre otros, de la fase de la infección, edad del paciente, volúmenes de muestras analizados.

En estos trabajos es necesario poner en evidencia que existen diversas causas que podrían generar problemas en la interpretación de resultados obtenidos. La calidad de los datos obtenidos de un PCR puede verse afectada negativamente por distintos factores tanto en la reacción de secuenciación del ADN, así como en cualquiera de sus fases (SCSIE, 2005).

Para el óptimo desarrollo de la prueba inicial, se deben tomar precauciones con el fin de evitar falsos resultados. Los controles internos garantizan la evaluación segura de los resultados, excluyendo los falsos positivos causados por contaminación. Estos controles proporcionan más seguridad de que la extracción se ha realizado de forma correcta. Se sugiere incluir controles negativos, por ejemplo, muestras que sean tan similares a las muestras de la prueba como sea posible, pero sin que contengan la diana. En laboratorios que tengan problemas con la contaminación cruzada, se recomienda al menos un control negativo por cada 5 muestras de diagnóstico. Tanto las muestras de control negativo como

las de control positivo deben entremezclarse de forma rutinaria con las muestras de diagnóstico para evaluar el funcionamiento de la prueba de la PCR (OIE, 2008).

Otro de los factores que pueden estar relacionados con la interpretación de resultados es no llegar a obtener secuencia molde (donde no hay ADN o hay mucho menos del necesario), o bien, que existan problemas en la reacción de secuenciación con los primers (que estos se encuentren degradados, que el primer no se una al molde, etc). Si se trata de productos de PCR, puede que los amplificados no sean producto de la amplificación de los dos primers (121, 122) si no que de uno (SCSIE, 2005).

En relación con los caninos, se puede plantear que la eficacia de ellos como centinelas del riesgo de infección doméstica y peridoméstica por *T. cruzi*, se encuentra en que presentan una respuesta medible al agente infeccioso. Los perros habitan en general un territorio definido; son accesibles, fáciles de enumerar y capturar y su población permite muestreos representativos (Lauricella *et al.*, 2006). Por otra parte, es importante destacar que entre los mecanismos directos de transmisión, se encuentra la vía oral. A pesar de que en Chile no se han reportado casos producidos por este tipo de transmisión y la vigilancia se aplica a los mecanismos de transmisión transfuncional y vectorial, la vía de transmisión oral es importante considerar (Toso *et al.*, 2011). Algunos estudios han registrado datos de infección a través de las mordidas de perros, ya que se ha encontrado *T. cruzi* en la saliva de perros con alta parasitemia (Graiff, 2010).

La abundancia relativa de caninos positivos del presente trabajo, se encuentra dentro del rango de reportes en estudios anteriores del país, los que se llevaron a cabo en distintos tamaños muestrales y con distintos métodos de análisis. En 1983, estudios en caninos de la provincia del Limarí arrojaron un 19,8% de positividad a *Trypanosoma cruzi* (Ríos, 1983). En el mismo año en Valparaíso a través de hemoaglutinación indirecta, caninos presentaron un 7% de positividad (Flores *et al.*, 1984) al igual que el estudio realizado por Uribe (2008) en Calera de Tango y Til-Til. A pesar de su importancia, los estudios en caninos son escasos en el país.

Dentro de los últimos reportes se encuentra el realizado en una zona rural de la región de Valparaíso a través de la técnica de PCR, con un 29% de perros positivos a *T. cruzi*

(Urrutia, 2015). Por otro lado, a nivel internacional si se encuentran más reportes de *T. cruzi* en caninos a través de la técnica de PCR. En Brasil la técnica ha sido utilizada por Lucheis *et al.*, (2005) evaluando a 50 perros pertenecientes a 30 personas chagásicas crónicas, encontrando un 50% de prevalencia. En otro estudio realizado por Eloy y Lucheis (2012) obtuvieron 20% de caninos positivos. En Yucatán, México se obtuvo un 17,3% de positividad en un estudio de 345 perros (Jiménez-Coello *et al.*, 2008) resaltando la importancia de los caninos como portadores del protozoo en zonas pobladas por seres humanos. En la provincia del Chaco, Argentina, la técnica de PCR en perros seropositivos a *T. cruzi*, detectó un 91% de animales chagásicos (Enriquez *et al.*, 2013). La detección de caninos positivos demuestra que existe un riesgo, puesto que los perros diseminarían el parásito en el sector; además de indicar que existirían focos de triatomíneos donde se produciría transmisión vectorial, lo que aumentaría el riesgo tanto para sus propietarios como para otras personas de la comuna. Por lo tanto, la presencia de mascotas caninas infectadas otorga un enorme valor sanitario debido a la proximidad de estos animales al entorno humano.

En cuanto al sector en estudio, este trabajo no arrojó diferencias significativas en la proporción de caninos positivos en cada una de las localidades. Estas se encuentran distanciadas geográficamente, pero se ubican espacialmente en una zona en la que se producen condiciones ambientales similares favorables para la transmisión o mantención de *T. cruzi*, donde el clima es templado cálido con lluvias invernales (Rioseco y Tesser, 2012) y la vegetación es matorral espinoso de la serranía (Gajardo, 1995).

En la zona de Til-Til es importante mencionar el hallazgo de vectores silvestres infectados, lo que sugiere que los perros en estas localidades se infectan principalmente desde estos focos de triatomíneos al recorrer ambientes que son hábitats propicios para los vectores. Estudios demuestran que hay un proceso de crecimiento de estos vectores que tiende a la estabilización, en donde existe su reproducción (Bacigalupo *et al.*, 2006).

Triatoma infestans por otro lado, ha ido adaptándose de manera paulatina, primero era un insecto silvestre; luego, peridomiciliario, y actualmente está en zonas urbanas, en lugares donde no se pensaba que se podía encontrar.

Cuando se estudiaron los factores de riesgo para contraer el parásito, el análisis estadístico al que se sometieron los datos no permitió establecer que alguna de las variables pudiera explicar en alguna medida la presentación del parásito en la población canina estudiada. Existen varias posibles causales frente a esta situación, una de ellas es el tamaño muestral, que afecta la probabilidad de significación estadística a través del error estándar que se hace más pequeño cuantos más pacientes tenga el estudio. Así pues el valor de "p" es función de la magnitud de la diferencia entre dos grupos o dos variables y del tamaño de la muestra. Por esta razón una pequeña diferencia puede ser estadísticamente significativa si disponemos de un tamaño muestral lo suficientemente grande y por el contrario un efecto o diferencia relativamente grande puede no alcanzar la significación estadística debido a un pequeño tamaño muestral. Por estas razones los valores de "p" deben ser considerados solo como una guía y no como base de conclusiones definitivas e irrevocables (Díaz y Fernández, 2001).

Sin embargo, es importante definir y reconocer los factores de riesgo a los cuales los caninos se encuentren expuestos, ya que frente a esto, humanos y otras especies se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad.

Al estudiar aquellos caninos que resultaron positivos a *T. cruzi*, dentro de los factores estudiados, la desparasitación externa en estos animales fue de un 57,14% (sin obtener un dato preciso de la periodicidad de aplicación de productos). De acuerdo a un estudio en Argentina, la desparasitación como medida sanitaria en caninos, arrojó significancia para el evento de seropositividad a *T. cruzi*, considerándose como factor protector contra la enfermedad (Manrique, 2012).

Un 71,4% de los caninos positivos en este estudio contó con que el material de construcción de su casa fuera de madera. En estudios sobre los factores de riesgo y conocimiento de la enfermedad de chagas, según las opiniones de expertos nacionales e internacionales, el tipo de construcción de madera representa un "mediano riesgo" para la infección humana por *T. cruzi* (González, 2012). Por otro lado 92,8% de los caninos positivos contaban con acúmulo de material fuera de la vivienda.

La presencia de luminarias es otro de los factores que se pudieron incluir en la regresión logística. Un 92,8% de los caninos positivos contaban con luminaria del hogar.

A pesar de no arrojar valores significativos en el análisis estadístico, es importante considerar, pues según Bacigalupo *et al* (2006), los estados adultos del vector se desplazarían hacia las casas por medio del vuelo orientados por la luz de la zona, conllevando un mayor riesgo de infección.

Respecto al confinamiento de los perros estudiados un 75,8% de caninos positivos dormían fuera del hogar. Se considera que excluir de las habitaciones los animales domésticos principalmente los perros, puede reducir de manera importante la transmisión a los humanos (Reyes et al., 2002). Las salidas frecuentes al exterior de la propiedad permitirían mayor exposición a infectarse con el protozoo de *T. cruzi*.

La presencia de caninos infectados aumenta el riesgo de transmisión a los vectores, y de esta manera la probabilidad de infección en los humanos. Los perros podrían resultar buenos centinelas en los procesos de vigilancia en los programas de control vectorial. Se ha descrito que canes positivos conviven con personas que también tienen la infección (Lauricella et al., 2006).

En cuanto a la enfermedad en caninos, muchas veces los animales que padecen enfermedad de Chagas no muestran signos de enfermedad. Estos pueden llegar a presentar la enfermedad de forma aguda o crónica, y algunos perros pueden entrar en un periodo asintomático que puede durar meses a años, conllevando un desarrollo progresivo del parásito que conduce a la degeneración e inflamación del corazón, causando insuficiencia cardíaca y muerte. Un estudio en la región de Valparaíso, en 8 caninos positivos a *T. cruzi*, 4 presentó arritmia al ECG (Urrutia, 2015). La enfermedad de Chagas no tiene cura y el que sea zoonótica, hace que muchos veterinarios recomienden la eutanasia en las mascotas con sospecha de esta enfermedad. Dado que la prevención es la meta de cualquier programa, los caninos no debieran estar expuestos a vinchucas y para ello es imprescindible eliminar los riesgos asociados a diferentes factores de su entorno.

Los caninos positivos en este estudio son una señal de alerta para las autoridades sanitarias de la comuna como del resto las zonas endémicas, especialmente de los encargados de los programas de control de zoonosis. La dificultad para establecer los factores asociados a la

transmisión de la enfermedad invita a realizar investigaciones epidemiológicas más detalladas en las poblaciones de caninos domésticos en la localidad.

Elementos centrales para el control y la prevención de esta enfermedad en áreas endémicas, son sellar grietas y agujeros alrededor de las ventanas, techos, puertas y paredes, retirar pilas de madera, extracción de maleza y rocas en el peridomicilio, entre otras. También es relevante, mantener limpias las áreas en las que los caninos pasen tiempo y chequear periódicamente que esas áreas se encuentren libres de insectos. Utilizar mosqueteros en las puertas y ventanas. También asegurarse en lo posible de que las luces del patio no queden cerca de la casa, ya que las luces atraen los insectos.

Al mismo tiempo, los instrumentos que se utilizan para el manejo de esta enfermedad tienen severas limitaciones en cuanto a la prevención, detección y tratamiento de ésta. El diagnóstico es variable y de confiabilidad desconocida según el método que se use y las drogas utilizadas para tratamiento específico tienen altos niveles de toxicidad. Sin embargo, hay que destacar la marcada disminución en la transmisión de esta enfermedad a través de los programas de control de vectores y de las transfusiones sanguíneas.

Otro problema es que el control de vinchuca tiene dependencia exclusiva de insecticidas. Si se considera que la prevención de reinfestación de las casas por vectores requiere de rociados repetitivos, esto en el mediano plazo genera resistencia al insecticida. Existen actualmente insecticidas alternativos, pero su uso tiene problemas asociados al costo y toxicidad (Tarleton *et al.*, 2007).

El 16,3% de positividad de las presentes muestras debería generar una luz de alerta en el ámbito veterinario de la zona. Los resultados positivos en el presente estudio estimulan a profundizar investigaciones epidemiológicas en la localidad y sus alrededores. Finalmente, en la enfermedad de Chagas, el diagnóstico en los perros es una herramienta valiosa como screening de la enfermedad en un área geográfica determinada. Los resultados obtenidos en las tres localidades aportan información importante para la ejecución de acciones sanitarias profundas en la localidad y en la región, debido a que no había datos de prevalencia actualizados en la región en estos animales de compañía.

CONCLUSIÓN

1. Existe un 16,3% de prevalencia a *Trypanosoma cruzi* en los caninos estudiados.
2. En las 3 localidades de la comuna hubo casos de perros con infección chagásica.
3. No se encontró asociación significativa entre los factores de riesgos considerados y los caninos positivos a *Trypanosoma cruzi*.
4. Los resultados indican que los habitantes de las localidades de la comuna de Til-Til pueden estar expuestos a un riesgo de infección con esta parasitosis.

BIBLIOGRAFÍA

ACUÑA, M. 2002. La vinchuca silvestre: ¿una amenaza latente? Tecno. Vet. N°8. [en línea]<http://web.uchile.cl/vignette/tecnovet/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9633%2526ISID%253D471,00.html> [consulta: 12-05-2015].

ARRIAZA, B; ORELLANA, N. 2010. Enfermedad de Chagas en poblaciones prehistóricas de Chile. Rev. Chil. Hist. Nat. 83(4): 531-541.

BACIGALUPO, A; SEGURA, J; GARCIA, A; HIDALGO, J; GALUPPO; CATTAN, P. 2006. Primer hallazgo de vectores de la enfermedad de Chagas asociados a matorrales silvestres en la Región Metropolitana, Chile. Rev. Med. Chile 134:1230-1236.

BACIGALUPO, A; SEGOVIA, V; GARCÍA, A; BOTTO-MAHAN, C; ORTIZ, S; SOLARI, A; ACUÑA-RETAMAR, M; TORRES-PEREZ, F; CATTAN, P; 2012. Differential Pattern of Infection of Sylvatic Nymphs and Domiciliary Adults of *Triatomainfestans* with *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Chile. Am. J. Trop. Med. Hyg., 87(3): 473–480.

BIBLIOTECA DEL CONGRESO NACIONAL DE CHILE. 2012. Reportes estadísticos y comunales. [en línea] <<http://reportescomunales.bcn.cl/2012/index.php/Tiltit>> [consulta: 15-07-2015].

BRUSÉS, B; GORODNER, J; LUCERO, R. 2004. Genotipificación de *Trypanosomacruzi* mediante la técnica LSSP-PCR. In: Reunión de Comunicaciones científicas y tecnológicas. Resistencia, Chaco. Argentina. 2004. Universidad Nacional del Nordeste; Instituto de Medicina Regional. Resumen: M-040.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2013. Parasites-American Trypanosomiasis. [en línea]. <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>> [consulta: 01-10-2014].

DÍAZ, P; FERNÁNDEZ, P. 2001. Significancia estadística y relevancia clínica. [en línea] <https://www.fisterra.com/mbe/investiga/signi_estadi/signi_estadisti2.pdf> [consulta: 12-10-2016]

DÍAZ, P; FERNÁNDEZ, P. 2004. Asociación de variables cualitativas: El test exacto de Fisher y el test de McNemar. [en línea] <http://www.agamfec.com/pdf/CADERNOS/VOL11/VOL11_5/14_Invest_N11_5.pdf> [consulta: 10-08-2016].

ELOY, L; LUCHEIS, S. 2012. Hemoculture and Polymerase Chain Reaction Using Primers TCZ1/TCZ2 for the Diagnosis of Canine and Feline. Trypanosomiasis. International Scholarly Research Network ISRN Veterinary Science Volume, Article ID 419378.Pp.1-6.

ENRIQUEZ G.; CARDINAL M.; OROZCO M.; SCHIJMAN A.; GÜRTLER R. 2013. Detection of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally-infected dogs and cats using serological, parasitological and molecular methods. Acta Trop. June; 126(3): Pp. 211–217.

FLORES, B; HERNÁNDEZ, G; LEPE, A; CONTRERAS, M; SANDOVAL, L; VILLARROEL, F; ROJAS, A; GONZÁLEZ, O; SCHENONE, H. 1984. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile. Sectores rurales. Infestación triatomídea domiciliaria e infección por *Trypanosomacruzi* del vector y de mamíferos domésticos de la V Región. Bol. Chil. Parasitol. 39: 62-65.

GAJARDO, R. 1995. La vegetación natural de Chile. Clasificación y distribución geográfica. 2ª Ed. Editorial Universitaria, Santiago. 165p.

GONZALEZ, R. 2012. Determinación del nivel de conocimiento de la enfermedad de chagas, del riesgo de infestación vectorial domiciliaria e infección en la población rural de tres regiones endémicas de Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Fac. Cs Veterinarias y Pecuarias. U. Chile. 12 p.

GRAIFF, S. 2010. Relación entre perros seropositivos a *Trypanosomacruzi* y alteraciones electrocardiográficas compatibles con miocardiopatía chagásica canina en la localidad de la Para (Córdoba-Argentina). Tesis Magister Scientae en Ciencias Veterinarias. Córdoba, Argentina. Universidad Nacional del Litoral, Fac. Cs. Veterinarias. 33-35 p.

GURTLER, R.E; CECERE, M.C; LAURICELLA, M.A; CARDINAL, M.V; KITRON, U.; COHEN, J.E. 2007. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. Parasitology. 134: 69-82.

INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE. 2012. Vigilancia para Enfermedad de Chagas 2005 - 2011: Componente vectorial. Boletín vol 2 (1) [en línea]. <<http://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADn%20Chagas%20Corregido%20final.pdf>> [consulta: 14-03-2015].

JIMÉNEZ-COELLO M.; POOT-COB M.; ORTEGA-PACHECO A.; GUZMÁN-MARÍN E.; RAMOSLIGONIO A.; SAURI-ARCEO C.; ACOSTA-VIANA K. 2008. American Trypanosomiasis in Dogs from an Urban and Rural Area of Yucatán, México. Vector-Borne and zoonotic diseases. Volume 8, Number 6. Pp:755-61.

JUNQUEIRA, A.C.; CHIARI, E.; WINCKER, P. 1996. Comparison of the Polymerase Chain Reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 90(2):129-132.

LAURICELLA, M.; CECERE M.; CEBALLOS L.; VASQUEZ G. 2006. Vigilancia de la infección de *Trypanosomacruzi* en perros y gatos en una zona rural del noroeste de Argentina. Revista Panamericana de Salud Publica. 20(5):348 p.

LUCHEIS S.; DA SILVA A.; ARAÚJO J.; LANGONI H.; MEIRA D.; MARCONDES-MACHADO J. 2005. Trypanosomatids in dogs belonging to individuals

with chronic Chagas disease living in Botucatu town and surrounding region. São Paulo State, Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2005; 11(4):492-509.

MANRIQUE, D; MANRIQUE, F; LORCA, M; OSPINA, J. 2012. Prevalencia de anticuerpos para *Trypanosomacruzi* en caninos de dos municipios endémicos de Boyacá. *Rev.MVZ Córdoba*. 17(1): 2916-2923

MARTÍNEZ, I; CERVANTES-LADÍN, A; ESPINOZA, B. 2013. Diagnóstico molecular de la Enfermedad de Chagas. *Gac. Méd. Méx.* 149: 363-365.

MINISTERIO DE SALUD. 2014. Enfermedad de Chagas. Boletín epidemiológico trimestral. Vol 110 (1): 1-3.[en línea]<http://epi.minsal.cl/epi/html/AtlasInteractivos/AtlasBET/2014/ABET_02/CHA_BET_2_2014.pdf> [consulta: 10-09-2014].

NEGHME, A; SCHENONE, H. 1960. Resumen de veinte años de investigación sobre la enfermedad de Chagas en Chile. *Rev. Med. Chile*. 88: 82-93.

OIE. 2008. Validación y control de calidad de los métodos de la reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. [en línea] <http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/1.01.05.%20Validadci%C3%B3n%20y%20control%20de%20calidad.pdf> [consulta: 26-12-2016].

PEDUZZI, P.; CONCATO, J.; KEMPER, E.; HOLFORD, T.; FEINSTEIN, A. 1996. A Simulation Study of the Number of Events per Variable in Logistic Regression Analysis. *J ClinEpidemiol* 49(12): 1373- 1379.

ROVID, A. 2010. Tripanosomiasis Americana (Enfermedad de Chagas). [en línea] <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tripanosomiasis_americana_chagas.pdf> [consulta: 06-10-2014].

REYES, L; SILESKY, E; CERDAS, C; CHINCHILLA, M; GUERRERO, O. 2002. Presencia de anticuerpos contra *Trypanosomacruzi* en perros de Costa Rica. *ParasitolLatinoam* 57: 66 – 68

RÍOS, A. 1989. Estudio de la enfermedad de chagas, en animales sinantrópicos domésticos en un área hiperendémica (Valle de Limarí, IV Región, Chile). [en línea] <<http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/index.php/ACV/article/view/4562/4450>> [consulta: 07-01-2017].

RIOSECO, R y TESSER, C. 2012. Cartografía Interactiva de los climas de Chile Instituto de Geografía. Pontificia Universidad Católica de Chile. [en línea] <www.uc.cl/sw_educ/geografia/cartografiainteractiva> [consulta: 05-09-2016].

ROCHA, M. 2006. Rendimiento del xenodiagnóstico y reacción de polimerasa en la detección de *Trypanosomacruzi* en deyecciones de triatomíneos. Región Metropolitana. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Fac. Cs Veterinarias y Pecuarias. U. Chile.

ROZAS, M; BOTTO-MAHAN, C; CORONADO, X; ORTIZ, S; CATTAN, P; SOLARI, A. 2005. Short Report: *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals from a chagasic area of Chile. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73(3): 517–519.

SCSIE. Servei Central de Suport a la Investigació Experimental. 2005. Guía para la secuenciación automática de ADN. [en línea] <http://www.uv.es/scsiweb/SCSIE/SCSIE-GEN/guia_para_la_secuenciacion_automatica_de_ADN.pdf> [consulta 06-05-2016]

SEQC. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA Y PATOLOGÍA MOLECULAR. 2007. Regresión Logística. [en línea] <http://www.seqc.es/es/Varios/7/40/Modulo_3:_Regresion_logistica_y_multiple/> [consulta: 18- 04-2016]

TARLETON, R.; REITHINGER, R.; URBINA, J.; KITRON, U.; GURTNER, R. 2007. The Challenges of Chagas Disease— Grim Outlook or Glimmer of Hope? [en línea] <<http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0040332>> [consulta: 20-09-2016].

TOSO, A; VIAL, F; GALANTI, N. 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. Rev. Med. Chile. 139(2): 258-266.

URIBE, J. 2008. Infección por *Trypanosomacruzi* en grupos familiares y perros de viviendas positivas al vector triatoma infestans: Calera de Tango y TilTil, Región Metropolitana. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Fac. Cs Veterinarias y Pecuarias. U. Chile. 23 p.

URRUTIA, S. 2015. Prevalencia de *trypanosomacruzi* mediante técnica molecular (PCR) en caninos del sector de la Cuesta de la Dormida en la Quinta Región, Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Concepción, Chile. Facultad Recursos Naturales y Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Santo Tomás.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2015. Chagas disease (American trypanosomiasis) [en línea]. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> [consulta 31-10-2015].

WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J.; CARDOSO, M.; MOELEMANN, W.; MOREL, C. 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a endemic rural area. Am J TropMedHyg. 51(6): 771-777.

ANEXO n°1

**Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
UNIVERSIDAD DE CHILE
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Mediante la presente carta, yo (nombre)

_____, declaro habitar en la
localidad de _____ y autorizo y acepto que:

	Responda SÍ o NO
- Me realicen una encuesta	

Los datos obtenidos por medio de la encuesta, serán utilizados para evaluar el riesgo de enfermedad de Chagas en la Región Metropolitana. Esta investigación se realizará bajo la supervisión del académico de la Universidad de Chile responsable del estudio, Dr. Pedro E. Cattán, y/o de la co-investigadora Lic. Antonella Bacigalupo.

También se me indicó que este estudio tiene por objetivo estimar factores de riesgo para la enfermedad de Chagas y su prevalencia; que la participación es voluntaria; que no habrá retribución monetaria por participar en el estudio, y que se mantendrá la confidencialidad de los datos personales obtenidos por medio de la encuesta; es decir, al publicar los resultados del estudio no aparecerá ningún nombre.

Se requiere firmar este documento para que los datos puedan ser usados en el proyecto de investigación y así cumplir con las normas éticas.

Firma Propietario / Encuestado

Nombre y Firma Encuestador

Fecha: _____

CONTACTO:

Pedro E. Cattán

Antonella Bacigalupo

Teléfono fijo: 229785629

29785637

Celular: 9-76670490

9-8655420 y 9-3407126



ANEXO n° 2

ENCUESTA A PROPIETARIOS DE ANIMALES DOMÉSTICOS



Lo invitamos a participar en un estudio que busca conocer algunos aspectos poco conocidos de la Enfermedad de Chagas en Chile. Su participación es muy relevante para nosotros, ya que nos interesa entender lo que usted conoce acerca de esta enfermedad, y la relación de esta enfermedad con sus animales.

Si decide participar, le pediremos que conteste una breve encuesta que no tomará más de media hora, además de permitirnos obtener algunas muestras de sus animales domésticos y de los animales silvestres que capturemos en proximidad a su casa. Es probable que volvamos para tomar nuevamente muestras de sus animales, para lo cual le solicitaremos una forma de contactarlo, la que nos servirá además para informarle de algunos resultados obtenidos a partir de su colaboración.

1. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO A PARTICIPAR DEL ESTUDIO

Le invitamos a que participe en un estudio de investigación de la Universidad de Chile sobre una enfermedad que se produce en esta zona, respondiendo un pequeño cuestionario y permitiendo que los investigadores tomen muestras de sangre a sus animales y capturen animales silvestres en su propiedad.

Firmando este consentimiento, usted declara estar totalmente de acuerdo con que sus respuestas sean analizadas y procesadas para este estudio de investigación; sin embargo sus datos personales serán mantenidos en absoluta reserva.

Además, se le entregará la información concerniente al resultado del examen de sangre de sus animales domésticos.

- Participaré en el Cuestionario.

Nombre _____

Firma _____ Fecha _____

Autorizo la toma de muestra a mis animales domésticos.

Firma _____

1. Identificación de encuestado

NÚMERO DE ENCUESTA: _____

Sitio de estudio: _____

Nombre: _____

Teléfono: _____

2. Características de sus animales domésticos (ganado, carnívoros)

a. Tamaño (rangos)

- 1) ¿Podría indicar el número aproximado de animales que tiene actualmente y cuáles duermen dentro de la casa?

Especie	Ud. es el dueño?		Rango (poner X en indicado)						N° que duermen dentro de la casa
	Si	No	1-4	5-20	20-49	50-100	>100	NS / NR*	
Perro									
Gato									
Aves									
Roedores									
Cerdos									
Vacas									
Caballos									
Ovejas									
Cabras									
Otro** (especificar)									

Aspectos demográficos (edad, sexos, etc.) y sanitarios

- 1) Respecto de sus animales, ¿podría indicar la edad y sexo de ellos, además de cierta información sobre sus cuidados?

Especie	Sexo (número)		Edad (Número)					Están vacunados ? Contra qué?	Sanidad desparasitación (interno o externa o ambas)
	Mac hos	Hem bras	< 6 mes es	6 – 12 meses	1 – 2 años	2 – 4 años	> 4 años		
Perro									
Gato									
Aves									
Roedores									
Cerdos									
Vacas									
Caballos									
Ovejas									
Cabras									

Origen de sus animales

Especie	Lugar de nacimiento del animal (de adquisición si no lo sabe) Marcar con X respuesta afirmativa y agregar otros datos que aporten			
	Mismo predio	Misma localidad	Misma comuna	Misma Región
Perro				
Gato				
Aves				
Roedores				
Cerdos				
Vacas				
Caballos				
Ovejas				
Cabras				

Características del pastoreo y del desplazamiento (apoyo por mapas, diferencias pastoreo de veranada de aquel el resto del año)

Especie	Encierro o Refugio para animal		Material del recinto	Sale del recinto?		Qué distancia recorre?				Animal sale bajo supervisión? Si/no
	Distancia a la casa	Tiempo de encierro		Sí	No	<500 m	500 m- 1 Km	1 - 5 Km	>5 Km	
Cerdos										
Vacas										
Caballos										
Ovejas										
Cabras										
Mula										
Burro										

Posibles reservorios silvestres o sinantrópicos

¿Qué mamíferos silvestres ha observado?

Especie	Observación (Sí/No)	Ubicación (X)		Conocimiento	
		Dentro/ fuera	Sabe ¿el nombre?	¿Cuántas especies distintas ha visto?	Establo (E)/ Corral (C)/ Gallinero (G)
Ratones					
Conejos					
Otros *					

- 1) En el caso de haber observado alguna de las especies mencionadas anteriormente, ¿ha utilizado durante los últimos 6 meses algún sistema para su control o erradicación? (cebo rodenticida, fumigación con insecticida, caza, trampas, etc.)

(Sí/No) _____ Qué producto usó? _____ Cuándo lo usó?

3. Conocimiento acerca de Chagas/vinchucas

a. Conocimiento respecto de la enfermedad

- 1) ¿Conoce la Enfermedad de Chagas? (Sí/No) _____
- 2) ¿Me la puede describir?
- 3) ¿Algún habitante de esta casa ha tenido o tiene la enfermedad de Chagas? (Sí/No) _____
- 4) ¿Quiénes? (preguntar relación familiar si no quiere decir nombre)
- 5) En caso de responder "Sí". ¿Se lo dijo un médico? SI _____ NO _____ No sabe _____

b. Reconocimiento del vector

- 1) ¿Conoce las vinchucas? (Si/No/Le han contado/La conoce con otro nombre)
- 2) ¿Qué son?

c. Lugares de avistamiento del vector

- 1) ¿Ha visto estos insectos? (Sí/No) {mostrar imágenes} _____
- 2) Si es que los ha visto, ¿En qué lugares los ha visto?
- 3) ¿A qué hora del día se ven más frecuentemente estas vinchucas?
Atardecer _____ Noche _____ Mañana _____ Amanecer _____ Tarde _____
- 4) En qué estados parecieran estar las vinchucas (Mostrar fotos, preguntar de otra forma). Alternativa: tamaño y colores de las vinchucas que vio
Ninfas _____ Adultos _____ No sabe _____ Chica _____ Grande _____ Roja _____
Negra _____ Café _____ Gris _____
- 5) ¿En qué meses del año se han visto frecuentemente? (Marcar con X lo(s) meses indicados)
Ene _____ Feb _____ Mar _____ Abr _____ May _____ Jun _____ Jul _____ Ago _____ Sep _____ Oct _____
Nov _____ Dic _____

d. Contacto con vinchucas

- 1) Donde sus animales habitualmente viven (donde duermen o donde están en el día), ha observado vinchucas? (Sí/No) _____
- 2) De _____ qué _____ animales?

- ¿En qué momento del día ha observado vinchucas?
(noche/día/atardecer/amanecer/mediodía/hora/rango de horas/cualquier momento)

4. CARACTERISTICAS DE LA CASA Y PERIDOMICILIO

a. Disponibilidad de servicios básicos (luz, agua, gas)

- 1) ¿Su casa posee los siguientes servicios? (Sí/No)
Agua potable _____ Alcantarillado _____ Pozo _____ Gas _____
_____ Electricidad _____
- 2) Presencia de luminaria pública (postes de luz en la calle) (Sí/No) _____

- 3) Presencia de farol (luz que enciendan de noche hacia afuera) en las cercanías o exteriores de la casa? (Sí/No)

Material de construcción de la Casa (X)				
Adobe	Madera	Cemento	Zinc	Otro
Presencia de Separaciones o grietas (agujeros, hoyos) (X)				
Entre techo y pared				
Entre piso y pared				
Pared				
Otros				
No tiene				


Piso (suelo) (X)									
Tierra	Madera		Cemento		Baldosa	Alfombra	Otro (especificar)		
Techo (X)									
Madera	Latas		Paja	Palm era	Teja	Otro (especificar)			
Ventanas (Nº)			Peridomicilio [100 mts alrededor casa] (X)						
Total ventanas	Sí	No	Acúmu lo de basura	Mader a o Leña	Ladrillos / escombr os	Pircas o piedras	Chagual es cactus palmeras	Establos ,corrales gallinerp perreras	Aflora miento rocoso
Vidrio									
Cortinas									
Persianas									
Malla M.									

- 1) Otra estructura en peridomicilio que sea destacable (qué y por qué)
- 2) Presencia de Vegetación aledaña a la casa (especificar tipos y cantidad de árboles, plantas)

REVISAR SI FALTÓ PREGUNTAR O RELLENAR ALGO.

Entrega de cartilla informativa Y AGRADECER POR PARTICIPAR

ANEXO n°3



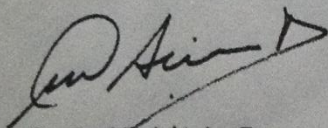
UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Comité de Bioética Animal

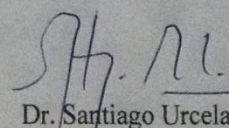
Santiago, 4 de octubre de 2013


CERTIFICADO

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del del Proyecto Fondecyt Regular 2014 titulado “**Epidemiological relevance of the parasite load in vectors and mammalian reservoirs of Chagas disease regarding diet and foci characteristics of triatomines**”, cuyo investigador principal es el Dr. **Pedro E. Cattán**, el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile certifica que éstos Protocolos satisfacen lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y no contraviene la legislación chilena vigente sobre la materia.

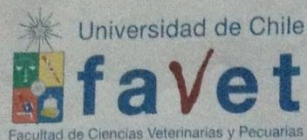
A este respecto el Comité estima que el estudio propuesto usa animales silvestres y domésticos en calidad y cantidad mínima necesaria para obtener resultados válidos, realiza intervenciones médico veterinarias autorizadas, bajo consentimiento informado, que garantizan la exclusión de sufrimiento innecesario a los animales y da cuenta apropiada de los criterios de punto final requeridos para el efecto.


Dr. José Luis Arias B.
Director
Comité de Bioética Animal


Dr. Santiago Urcelay
Presidente
Comité de Bioética Animal



ANEXO n°4



CERTIFICADO N° 29

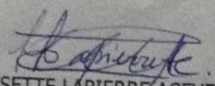
Santiago 07 de Octubre de 2013

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, revisó el proyecto titulado: "Epidemiological relevance of the parasite load in vectors and mammalian reservoirs of Chagas disease regarding diet and foci characteristics of triatomines" el cual será presentado para su exanimación en el concurso FONDECYT Regular 2014 de CONICYT, y cuyo Investigador Responsable es el Dr. Pedro E Cattán.

En el proyecto se estipulan las siguientes medidas de Bioseguridad:

- 1.- El Personal a cargo de la toma de muestra está entrenado y calificado para realizar dicho trabajo.
- 2.- Uso de vestimenta adecuada y desinfectantes adecuados para realizar el trabajo en terreno y en el laboratorio.
- 2.- Uso de campanas de flujo para el trabajo con material biológico.
- 3.- Los desechos biológicos serán autoclavados para posteriormente ser eliminados a la basura común.

Con relación a lo expuesto, este comité estima que el proyecto se ajusta convenientemente con las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas de Bioseguridad" editado por CONICYT versión 2008 y previenen el riesgo para las personas, los animales y el medioambiente.


LISETTE LAPIERRE ACEVEDO

Coordinadora
Comité de Bioseguridad



