



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

**EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR *Trypanosoma cruzi*
EN PERROS (*Canis lupus familiaris*) DE SECTORES RURALES DE LA
REGIÓN DE COQUIMBO**

Nicolás Gonzalo Vergara Venegas

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

PROFESOR GUÍA: Catalina Muñoz San Martín
Universidad de Chile

CONICYT-FONDECYT 1140650, 1180940, 3170799

SANTIAGO, CHILE
AÑO 2019



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR *Trypanosoma cruzi*
EN PERROS (*Canis lupus familiaris*) DE SECTORES RURALES DE LA
REGIÓN DE COQUIMBO**

Nicolás Gonzalo Vergara Venegas

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

Nota Final:

Prof. Guía: CATALINA MUÑOZ SAN MARTIN

Profesora Correctora: GALIA ANDREA RAMIREZ TOLOZA

Profesor Corrector: CRISTIAN GABRIEL TORRES MENDOZA

PROFESOR GUÍA: Catalina Muñoz San Martín

Universidad de Chile

CONICYT-FONDECYT 1140650, 1180940, 3170799

SANTIAGO, CHILE

2019

AGRADECIMIENTOS

Sinceramente, quisiera agradecer a todas las personas con las que compartí, independiente la cantidad de tiempo, cada una desencadenó pequeños-grandes cambios que aportaron para poder culminar este largo trayecto con la obtención del título de médico veterinario.

Agradezco a toda mi familia por estar siempre presente y en particular a mis padres, María Soledad Venegas Vera y Felipe Vergara Rojas, que me dieron esta oportunidad y que siempre han guiado mi camino pacientemente. También a mis hermanos, Rocío y Tomás, que me han ayudado muchísimo a crecer y a Camila Maggi que me ha acompañado a todas.

Agradezco a mis queridos(as) amigos(as): Ricardo, Aleide, Tomás, Rodrigo, Gabriel, Eddie, Marcelo, Catalina, Gianina, Daniela, Paz y Nicol por sumarle innumerables alegrías y aventuras a este trayecto.

Agradezco a mi profesora guía, Catalina Muñoz San Martín por haberse dado siempre un tiempo para resolver mis dudas y por haberme enseñado tanto sobre el trabajo de laboratorio.

Agradezco a todo el grupo del laboratorio por transformar ese espacio en un placentero lugar de trabajo, en el cual además siempre hubo disposición para ayudar, especialmente Antonella Bacigalupo que me ayudó mucho con el escrito y análisis estadístico.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
Enfermedad de Chagas	4
Diagnóstico	4
El parásito y su ciclo biológico	5
Vector triatomino	6
Perros	6
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Individuos del estudio	9
Zona de estudio	9
Muestras del estudio	9
Extracción de ADN	10
Ensayos de PCR tiempo real de ADN satelital de <i>T. cruzi</i>	10
Curva de calibración estándar de <i>T. cruzi</i>	10
Control interno de amplificación exógeno	11
Cuantificación	11
Control interno de amplificación endógeno	11
Declaración de Bioética	11
Declaración de Bioseguridad	12
Análisis estadístico	12
RESULTADOS	13
Ensayos PCR en tiempo real	13
Control interno de amplificación exógeno	13
Control interno de amplificación endógeno	14
Ensayos de PCR tiempo real de ADN satelital de <i>T. cruzi</i>	15
Resolución del objetivo 1	15
Resolución del objetivo 2	16
Edad	16
Condición corporal	17
Provincia	18
Sexo	19
Resolución del objetivo 3	20
Edad	20
Condición corporal	20
Provincia	20
Sexo	20
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXO N°1: CERTIFICADO DE BIOÉTICA	32
ANEXO N°2: CERTIFICADO DE BIOSEGURIDAD	33

RESUMEN

Se estima que la enfermedad de Chagas, producida por *Trypanosoma cruzi*, afecta a más de ocho millones de personas en la actualidad, principalmente en Latinoamérica. En Chile, el área endémica se extiende desde la Región de Arica hasta la Región de O'Higgins, resaltando la Región de Coquimbo por un alto reporte de triatomíneos. El parásito infecta a mamíferos, destacándose como reservorio doméstico el perro (*Canis lupus familiaris*). En Chile existen pocos estudios recientes sobre prevalencia en perros y ninguno en carga parasitaria, por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la infección por *T. cruzi* en perros de sectores rurales de la Región de Coquimbo, Chile, utilizando PCR en tiempo real para su cuantificación. Se dispuso de 380 muestras de sangre de perros muestreados en el año 2015 de ocho poblados rurales de la Región de Coquimbo. El parásito fue detectado en 29 de las 380 muestras (7,6% de infección) y dentro de las muestras positivas, todas tuvieron menos de 1 parásito equivalente/mL. Si bien las cargas parasitarias fueron bajas, el nivel de positividad en los perros indica que *T. cruzi* circula en sectores rurales cercanos al hombre. No se encontraron diferencias según edad, condición corporal, provincia o sexo respecto al estatus de infección. Respecto a las cargas parasitarias se encontró lo mismo, a excepción del sexo donde sí hubo diferencias indicando que las cargas parasitarias en hembras fueron mayores. Los perros de este estudio fueron infectados después de la interrupción vectorial declarada en 1999, y existe cierto riesgo de que la transmisión haya sido vectorial. Es por esto, que se recomienda mantener a los perros dentro o fuera del hogar, pero no en ambos espacios.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, reservorio doméstico, caninos, PCR tiempo real.

ABSTRACT

It is estimated that Chagas disease, produced by *Trypanosoma cruzi*, affects more than eight million people today, mainly in Latin America. In Chile, the endemic area extends from the Arica Region to the O'Higgins Region, highlighting the Coquimbo Region due to a high report of triatomines. The parasite infects mammals, with the dog (*Canis lupus familiaris*) standing out as a domestic reservoir. In Chile there are few recent studies on prevalence in dogs and none in parasite load, therefore, the objective of this study was to evaluate *T. cruzi* infection in dogs from rural areas of the Region of Coquimbo, Chile, using real time PCR for its quantification. There were 380 blood samples of canines sampled in 2015 from eight rural villages in the Coquimbo Region. Of the 380 samples, the parasite was detected in 29 (7.6% of infection) and within the positive samples, all had less than 1 equivalent parasite / mL. Although parasitic loads were low, the level of positivity in dogs indicates that *T. cruzi* circulates in rural areas near human settlements. No differences were found according to age, body condition, province or sex concerning the infection status. Regarding parasitic loads, the same was found, except for sex where there were differences indicating that parasitic loads in females were higher. The dogs in this study were infected after the vectorial interruption declared in 1999, and there is some risk that the transmission has been vectorial. This is why it is recommended to keep dogs inside or outside the home, but not in both spaces.

Key words: Chagas disease, domestic reservoir, canines, real time PCR.

INTRODUCCIÓN

Se estima que la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana afecta a más de ocho millones de personas actualmente, y es la enfermedad parasitaria más prevalente en América Latina (Moreira *et al.*, 2013; Rial *et al.*, 2017; WHO, 2017). La infección presenta una fase aguda con una alta parasitemia, pero que suele pasar inadvertida; Posteriormente se desarrolla una fase crónica, con una baja parasitemia, pero que puede presentar complicaciones cardíacas y/o digestivas capaces de causar la muerte (Rassi Jr *et al.*, 2012).

Su agente etiológico es *Trypanosoma cruzi*, protozoo que es capaz de diferenciarse en variados estadios con diferencias morfológicas y biológicas, acorde a su ciclo de vida (Rassi Jr *et al.*, 2012). Su principal vía de transmisión hacia los mamíferos es la vectorial, a través de insectos del orden Hemiptera, subfamilia Triatominae (Rassi Jr *et al.*, 2015).

La infección de *T. cruzi* se ha descrito en al menos 150 especies de mamíferos distintos, siendo los perros un gran foco de atención, ya que se han considerado como el principal reservorio doméstico en las dinámicas de infección por *T. cruzi* (Rassi Jr *et al.*, 2012; Arce-Fonseca *et al.*, 2017). Además, en los lugares en que persiste la transmisión vectorial domiciliaria, los humanos que viven con perros podrían aumentar hasta 5 veces el riesgo de contraer la parasitosis (Gurtler *et al.*, 2007). En Latinoamérica, se han detectado altos porcentajes de infección en perros de sectores rurales de países como Costa Rica, México y Argentina, destacando este último por incluir la carga parasitaria en el estudio pertinente (Montenegro *et al.*, 2002; Carrillo-Peraza *et al.*, 2014; Enriquez *et al.*, 2014). Sin embargo, en Chile existen pocos estudios en perros, destacando al menos 3 en los que se ha identificado solamente frecuencia de infección (Schenone *et al.*, 1991; Gonzalez *et al.*, 2015; Larrondo, 2017).

En particular, los perros de la región de Coquimbo probablemente tengan un alto riesgo de infección por *T. cruzi*, ya que en esta zona se han descrito recientemente altos porcentajes de infección tanto en mamíferos domésticos como sinantrópicos (Valenzuela, 2017; Yefi-Quinteros *et al.*, 2018). Además, se ha descrito que la carga parasitaria permitiría evaluar la capacidad que tienen los perros para transmitir *T. cruzi* a triatominos sanos (Enriquez *et al.*, 2014), por lo que este estudio evaluará la presencia y carga parasitaria de *T. cruzi* en caninos domésticos de sectores rurales de la región de Coquimbo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es producida por el protozoo flagelado *T. cruzi*, parásito que se encuentra naturalmente desde el sur de Estados Unidos hasta Chile y Argentina, extensión que se considera zona endémica, razón por la cual la enfermedad también es llamada tripanosomiasis americana (Waleckx *et al.*, 2014). Además, se ha descrito esta enfermedad en otras partes del mundo debido a las migraciones humanas, constituyendo un problema tanto para las zonas endémicas como para las que no lo son (Rassi Jr *et al.*, 2012; Arce-Fonseca *et al.*, 2017). En la actualidad existen aproximadamente ocho millones de personas afectadas en el mundo, constituyendo en Latinoamérica un problema de salud muy importante, destacando Argentina, Brasil y México como los países con mayor prevalencia (WHO, 2017).

La infección por *T. cruzi* en humanos inicia con una fase aguda que puede presentar signos clínicos desde ocho a diez días después de la invasión del parásito, pero que usualmente es asintomática (Rassi Jr *et al.*, 2012); dos a tres meses después de la infección inicial, momento en que desaparecen los signos de la fase aguda (si los hay) y desciende la parasitemia a niveles muy bajos, comienza la fase crónica (Rassi Jr *et al.*, 2012). Esta fase posee dos formas clínicas, predominando la indeterminada en la que no existe sintomatología, mientras que el 30 – 40% de los enfermos crónicos desarrollan una forma determinada por alteraciones cardíacas y/o digestivas que pueden causar la muerte (Rassi Jr *et al.*, 2012). Por último, cabe resaltar que experimentalmente se ha comprobado que en perros se desarrollan las mismas fases de infección, además de alteraciones cardíacas muy similares a las observadas en humanos, siendo un buen modelo para el estudio de la patogenia de la enfermedad (Guedes *et al.*, 2007; Cruz-Chan *et al.*, 2009).

Diagnóstico

Las opciones para diagnosticar la infección por *T. cruzi* en mamíferos varían según la fase de infección. Los primeros anticuerpos detectados pertenecen a la clase IgM, siendo reemplazados gradualmente por IgG a medida que progresa la infección (Rassi Jr *et al.*, 2015). En Chile, el diagnóstico serológico para humanos se realiza mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA (Apt *et al.*, 2013). La sensibilidad de estas

técnicas depende de la fase de la enfermedad y del tipo de inmunoglobulina estudiada. Por otra parte, el diagnóstico parasitológico se basa en la demostración de la presencia de *T. cruzi* mediante pruebas directas, aplicadas fundamentalmente en la fase aguda de la infección. Sin embargo, hoy en día los métodos directos moleculares son ampliamente utilizados en la fase crónica para determinar la etapa de la infección, evolución clínica y respuesta al tratamiento, entre otros (Muñoz *et al.*, 2013; Yefi-Quinteros *et al.*, 2018). Entre ellos destaca la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite amplificar secuencias repetitivas del ADN de *T. cruzi* mediante el uso de partidores específicos (Martinez *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2013). Actualmente, se ha demostrado que la utilización de PCR en tiempo real (qPCR) presenta una alta sensibilidad, además de permitir determinar la carga parasitaria a través de la cuantificación del ADN nuclear satelital de *T. cruzi* (Piron *et al.*, 2007; Duffy *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2013). El qPCR ha demostrado tener una adecuada sensibilidad en pacientes humanos con bajas cargas parasitarias, lo que indica la posibilidad de utilizar esta herramienta como método diagnóstico tanto en fase aguda como crónica de la infección (Moreira *et al.*, 2013). Por último, en un estudio de Enriquez y colaboradores se determinó que la sensibilidad de la qPCR fue de un 93% para gatos y de un 100% para perros (previamente analizados mediante métodos indirectos), correspondiendo los únicos falsos negativos a muestras de baja carga parasitaria (Enriquez *et al.*, 2014).

El parásito y su ciclo biológico

Trypanosoma cruzi es un parásito flagelado con un complejo ciclo biológico que presenta variadas formas de desarrollo en insectos vectores y mamíferos hospederos (Rassi Jr *et al.*, 2012). Los vectores son insectos hematófagos que ingieren a *T. cruzi* en forma de tripomastigotes sanguíneos al alimentarse de un mamífero infectado. El parásito debe lograr llegar al intestino medio del insecto para diferenciarse en epimastigote, forma replicativa. Posteriormente, se adhiere a las paredes del recto donde se diferencia en tripomastigote metacíclico, forma infectante para mamíferos. Aproximadamente 20 días después de ingerir el parásito, el insecto se vuelve infectivo (Russell *et al.*, 2013). Al alimentarse de la sangre de un mamífero, el vector libera sus deyecciones con la forma infectante del parásito, la cual es capaz de ingresar al hospedero mamífero a través de mucosas o heridas en la piel (Rassi Jr *et al.*, 2012; Russell *et al.*, 2013). El tripomastigote

metacíclico ingresa a una célula, se diferencia en amastigote y se replica por fisión binaria dentro del citoplasma celular durante 4-5 días, para luego salir nuevamente a la circulación en forma de tripomastigote sanguíneo tras lisis de la célula (Russell *et al.*, 2013). Éste tiene dos opciones para continuar su vida: una es ser ingerido por un triatomino, y así completar el ciclo, y la otra infectar otra célula para replicarse nuevamente en forma de amastigote (Russell *et al.*, 2013).

Vector triatomino

Se ha descrito la presencia de *T. cruzi* en más de 140 especies de insectos hematófagos (Rassi Jr *et al.*, 2012). Estos vectores pertenecen al orden Hemiptera, subfamilia Triatominae, que se caracterizan por tener aparato bucal succionador y alimentación hematófaga (Castillo y Wolff, 2000). Principalmente son de hábitos nocturnos, capaces de resistir largos ayunos luego de ingerir abundante alimento y tienen un ciclo biológico hemimetábolo que consta de una primera etapa en forma de huevo, cinco estadios inmaduros en forma de ninfa y un estadio adulto. (Castillo y Wolff, 2000). La hembra adulta es capaz de poner de 200 a 300 huevos en su vida en varios lotes (Russell *et al.*, 2013). En Chile se han descrito 4 especies de triatominos: *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai*, *Mepraia gajardoi* y *Mepraia parapatrica*, formando parte de los distintos ciclos de *T. cruzi* (Gonzalez *et al.*, 2015; Canals *et al.*, 2017). Entre los vectores presentes en Chile destacan *T. infestans* y *M. spinolai*; la primera se asocia a viviendas rurales mientras que la segunda ha sido caracterizada como una especie silvestre; sin embargo, ambas comparten parte de su distribución, encontrándose a veces *M. spinolai* en ambientes domésticos y *T. infestans* en silvestres, por lo que se consideran especies simpátricas (Canals *et al.*, 1999; Bacigalupo *et al.*, 2006).

Perros

Los perros son el reservorio doméstico más importante de la enfermedad de Chagas, en parte, ya que además de ser una gran fuente de alimentación para los vectores triatominos, también pueden masticar y comer insectos infectados, ruta de transmisión (mucosa oral) que se ha descrito en ratones de laboratorio, como más eficiente que la cutánea (Eickhoff *et al.*, 2013; Rosas *et al.*, 2016; Arce-Fonseca *et al.*, 2017). Asimismo, en los últimos años se ha descrito que la ruta de transmisión oral en humanos está asociada a infestaciones

parasitarias masivas y a presentaciones severas de la fase aguda con mayores porcentajes de mortalidad (Rassi *et al.*, 2010). Por otra parte, Gürtler y colaboradores señalan que en los países del cono sur donde *T. infestans* es el principal o único vector domiciliario, la prevalencia de infección en perros es frecuentemente mayor a la de las poblaciones humanas respectivas, mientras que en áreas donde hubo interrupción vectorial domiciliaria o donde simplemente no existe, han sugerido a los perros como centinelas de la presencia de *T. cruzi* en el peridomicilio, señalando que sistemas de vigilancia en los perros podrían ser de gran ayuda para diseñar programas de control en áreas donde los principales responsables de la infección humana son vectores silvestres (Castanera *et al.*, 1998; Gurtler *et al.*, 2007; Pineda *et al.*, 2011). También cabe destacar que los perros poseen una mayor infecciosidad (entendiéndose como la proporción de triatominos libres de infección que se infectan luego de alimentarse una sola vez de un mamífero infectado) que los humanos, siendo este parámetro positiva y significativamente asociado a la carga parasitaria y al índice de condición corporal de los caninos estudiados (Enriquez *et al.*, 2014). Finalmente, del punto de vista veterinario es importante considerar que los perros pueden cursar las mismas fases de infección que los humanos, e inclusive desarrollar enfermedad y eventualmente morir por miocarditis crónica (Gurtler y Cardinal, 2015). Entre las alteraciones histológicas destaca la inflamación por infiltraciones focales de células mononucleares en las paredes del corazón con claro tropismo por el ventrículo derecho, observadas en perros seropositivos (Cruz-Chan *et al.*, 2009).

En Chile existen solamente dos estudios dentro de la región de Coquimbo sobre infección por *T. cruzi* en perros, los cuales fueron previos a la interrupción vectorial declarada en 1999. En el primer estudio realizado en 1982, se analizó la frecuencia de infección en distintos animales, obteniendo un 15,6% en perros (N=224). El método de diagnóstico utilizado fue la reacción de hemaglutinación indirecta (Correa *et al.*, 1982). En el segundo estudio realizado en 1986, mediante el mismo método diagnóstico, se obtuvo un 19,8% de perros positivos (N=202) (Ríos *et al.*, 1986).

En vista de estos últimos antecedentes, además de los resultados ya mencionados de Enriquez y colaboradores (Enriquez *et al.*, 2014), se ha considerado relevante aportar datos actualizados sobre la presencia y carga parasitaria de *T. cruzi* en perros de sectores rurales de la región de Coquimbo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia y carga parasitaria de *Trypanosoma cruzi* en perros (*Canis lupus familiaris*) de sectores rurales de la región de Coquimbo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la carga parasitaria de *Trypanosoma cruzi* en sangre de perros de sectores rurales de la región de Coquimbo.
2. Relacionar la presencia de *Trypanosoma cruzi* con la edad, condición corporal, provincia y sexo de los perros muestreados.
3. Relacionar la carga parasitaria de *Trypanosoma cruzi* con la edad, condición corporal, provincia y sexo de los perros positivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Individuos del estudio

El estudio se realizó con un total de 380 muestras de sangre de perros tomadas en el verano del 2015 dentro del marco del proyecto CONICYT-FONDECYT 1140650. Estas muestras fueron conservadas en refrigeración (4°C) en el laboratorio de Ecología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La edad de los individuos se dividió en 3 grupos: cero a dos años (N=128), tres a cinco años (N=128) y seis a quince años (N=124); para la condición corporal (CC) mediante observación de la zona intercostal, lumbar y base de la cola se evaluó grasa corporal y se clasificó en 3 grados: baja (N=57), óptima (N=299) y alta (N=24); las provincias evaluadas fueron: Provincia de Elqui (N=162), Provincia de Limarí (N=132) y Provincia de Choapa (N=81); y según sexo: machos (N=288) y hembras (N=92).

Zona de estudio

Se evaluaron muestras provenientes de ocho localidades de la Región de Coquimbo, correspondientes a tres Provincias localizadas latitudinalmente de norte a sur: Provincia de Elqui: localidad de Gualiguaica, Comuna de Vicuña (30°00'15"S 70°49'00"O); Peralillo, Comuna de Vicuña (30°03'33"S 70°68'33"O) y Cochiguaz, Comuna de Paihuano (30°8'29"S 70°24'20"O); Provincia de Limarí, incluyendo a Tulahuén, Comuna de Monte Patria (31°01'67"S 70°73'33"O); Valle Hermoso, Comuna de Combarbalá (31°15'00"S 70°45'00"O) y La Rinconada, Comuna de Punitaqui (30°54'00"S 71°16'00"O) ; Provincia de Choapa, comprendiendo Matancilla, Comuna de Illapel (31°45'64"S 71°04'77"O), y Tranquilla, Comuna de Salamanca (31°52'59"S 70°43'50"O).

Muestras del estudio

Se dispuso de 0,5 mL de sangre periférica de cada individuo, preservada con igual volumen de solución de Guanidina - HCl 6M y EDTA 0.2M (GEB). Las muestras fueron calentadas a baño María a 95°C por 15 minutos y posteriormente conservadas a 4°C hasta la extracción y purificación del ADN.

Extracción de ADN

La preparación del ADN de las muestras de caninos se realizó a partir de un volumen de 200 µL de GEB utilizando el Mini Kit innuPREP Blood DNA (Analytikjena AG) según las recomendaciones del fabricante. Las muestras extraídas fueron conservadas a -20°C hasta su análisis molecular.

Ensayos de PCR tiempo real de ADN satelital de *T. cruzi*

Se evaluó la cantidad de *T. cruzi* en las muestras a través de qPCR con los partidores *Cruzi* 1 5'ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA 3' y *Cruzi* 2 5'AATTCCTCCA AGCAGCGGATA 3' (Piron *et al.*, 2007), que amplifican la región nuclear satelital de *T. cruzi*. Los ensayos se realizaron en un termociclador *Rotor-Gene*® (QIAGEN®) con un volumen final de 20 µL conteniendo 5µL de eluido, 1X *HOT FIREPol*® *EvaGreen*® *qPCRMix Plus* (SolisBioDyne), 0,3 µM de cada partidor y agua libre de nucleasas para completar el volumen final. Cada reacción se llevó a cabo con un control negativo (ADN obtenido de sangre de perro libre de infección), un control positivo (ADN de sangre de perro contaminada con las cepas DM28c e Y de *T. cruzi*) y un control sin templado (agua libre de nucleasas). Todas las muestras se analizaron por duplicado. Las condiciones de ciclado fueron una pre-incubación de 15 min a 95°C seguido por 40 ciclos, cada uno con una etapa de desnaturalización a 95 °C por 15 s, una etapa de hibridación a 65 °C por 20 s y una etapa de extensión a 72 °C por 20 s. El registro de la fluorescencia emitida se realizó al final de cada ciclo y la curva de fusión se evaluó con una rampa de 72°C a 95°C aumentando 1°C en cada paso, esperando 90 segundos de acondicionamiento pre-fusión en el primer paso y 5 segundos para cada paso posterior.

Curva de calibración estándar de *T. cruzi*

Los estándares de DNA de *T. cruzi* para la cuantificación absoluta fueron obtenidos de ADN genómico de *T. cruzi* cepa DM28c (TcI) y cepa Y (TcII), debido a la variabilidad en la cantidad de copias de la región satélite de *T. cruzi* descrita según su unidad discreta de tipificación (DTU) (Duffy *et al.*, 2009; Ienne *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2013). Los cálculos se realizaron considerando que una célula parasitaria contiene aproximadamente 200 fg de ADN (Kooy *et al.*, 1989; Duffy *et al.*, 2009). Se realizaron diluciones seriadas

1/10 con agua libre de nucleasas para cubrir un rango entre 10^6 a 0,1 parásitos equivalentes/mL (par-eq/mL).

Control interno de amplificación exógeno

Todas las muestras fueron co-extraídas con 1 pg/ μ L de una secuencia de 183 pb de *Arabidopsis thaliana* generada por gBlocks® Gene Fragments (Integrated DNA Technologies IDT®) usada como un control interno de amplificación (IAC) exógeno para evaluar arrastre de inhibidores y pérdida de ADN en el proceso de extracción. Para esto, se realizaron ensayos de qPCR utilizando los partidores IAC Fw 5' ACCGTCATGGAACAGCACGTA 3' e IAC Rv 5' CTCCCGCAACAAACCCTATAAAT 3' (Duffy *et al.*, 2013) a una concentración final de 0,2 μ M y una temperatura de hibridación de 58 °C, cuyos resultados fueron calibrados con la curva estándar para el IAC que se realizó con diluciones de 2; 0,2; 0,02 y 0,002 pg/ μ L de gBlocks® Gene Fragments. Las otras condiciones de la reacción fueron las mismas descritas anteriormente para los ensayos de qPCR de *T. cruzi*.

Cuantificación

La cuantificación de los parásitos desde las muestras de ADN fue calculada considerando la amplificación de la curva estándar de ADN de *T. cruzi* y los resultados fueron normalizados de acuerdo a los resultados del IAC exógeno.

Control interno de amplificación endógeno

La evaluación de la integridad del ADN de las muestras negativas a *T. cruzi* fue medido a través de un control de amplificación endógeno. Para esto, se realizaron ensayos de qPCR utilizando los partidores GAPDH Fw 5' TGTCCCCACCCCAATGTATC 3' y GAPDH Rv 5' CTCCGATGCCTGCTTCACTACCTT 3' (Stassen *et al.*, 2015) a una concentración final de 0,2 μ M y una temperatura de hibridación de 65 °C. Las otras condiciones de la reacción fueron las mismas descritas anteriormente.

Declaración de Bioética

El presente estudio con muestras caninas se enmarcó en el proyecto CONICYT-FONDECYT 1140650, aprobado por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Anexo N°1), siguiendo los

principios internacionales para el uso de animales en investigación biomédica (CIOMS, 2012).

Declaración de Bioseguridad

Durante esta investigación se trabajó bajo medidas aprobadas por el Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile para el proyecto FONDECYT 1140650 (Anexo N°2).

Análisis estadístico

Objetivo 1: Evaluar la carga parasitaria de *T. cruzi* en sangre de perros de sectores rurales de la región de Coquimbo.

Se determinó la estadística descriptiva (Valor mínimo, valor máximo, mediana, media aritmética y desviación estándar) de la carga parasitaria de las muestras positivas.

Objetivo 2: Relacionar la presencia de *T. cruzi* según edad, condición corporal, provincia y sexo de los perros muestreados.

Se analizó mediante χ^2 la presencia/ausencia según edad, condición corporal y provincia, mientras que la variable sexo se analizó mediante Test exacto de Fisher.

Objetivo 3: Relacionar la carga parasitaria de *T. cruzi* según edad, condición corporal, provincia y sexo de los perros positivos.

Se analizó la distribución de la muestra mediante Test de Shapiro-Wilk. Luego, se evaluaron diferencias mediante Kruskal-Wallis (edad, CC y provincia) y Mann-Whitney (sexo).

Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad Prism7®, usando un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

Ensayos PCR en tiempo real

Control interno de amplificación exógeno

La amplificación de una región de 183 pb del ADN de *Arabidopsis thaliana* fue usada como control exógeno, siendo indicador de la pérdida de ADN y del arrastre de inhibidores de la PCR durante el proceso de extracción de ADN de cada muestra. Los valores del ciclo umbral (Ct) variaron entre 15,24 a 25,14 con una mediana de 17,05, una media de 17,27 y una desviación estándar (DS) de 1,27. Solamente una muestra tuvo Ct mayor a 25, la cual presentó buen rendimiento en el control endógeno (Fig.1).

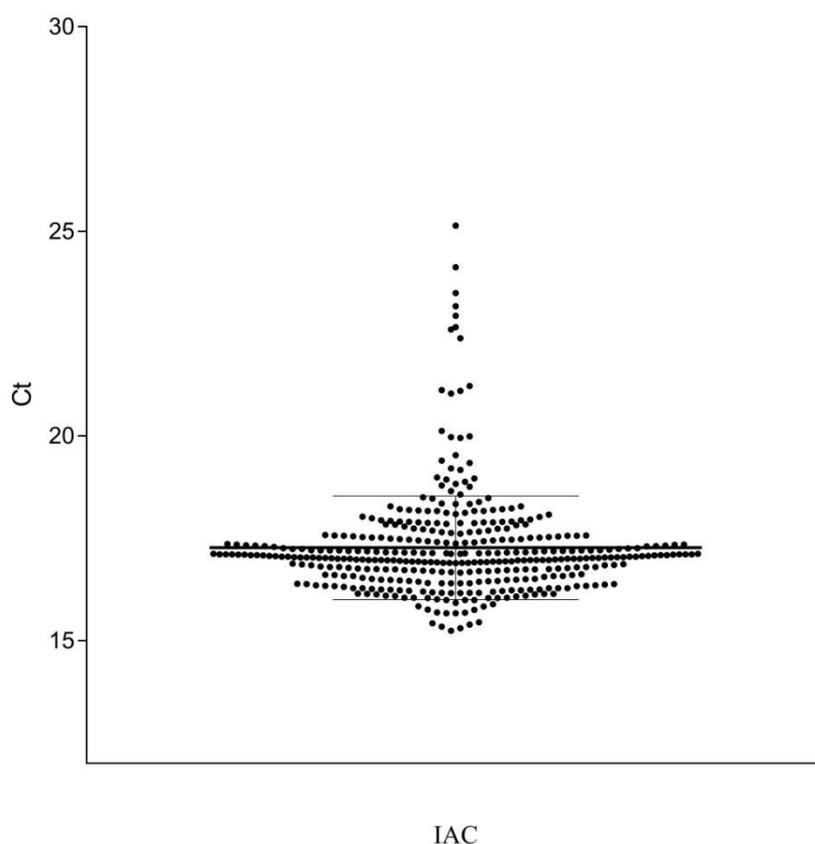


Figura 1. Diagrama de dispersión de puntos de valores de Ct del control interno exógeno. Las líneas muestran la media con la desviación estándar. Ct: ciclo umbral.

Control interno de amplificación endógeno

La amplificación de los partidores GAPDH Fw y GAPDH Rv del ADN de perro fue usada como control de calidad del ADN. Los valores de Ct para las muestras variaron entre 13,43 a 25,47 con una media de 18,97 y una DS de 1,89. Un total de tres muestras presentaron un valor de Ct igual o superior a 25 (Fig 2).

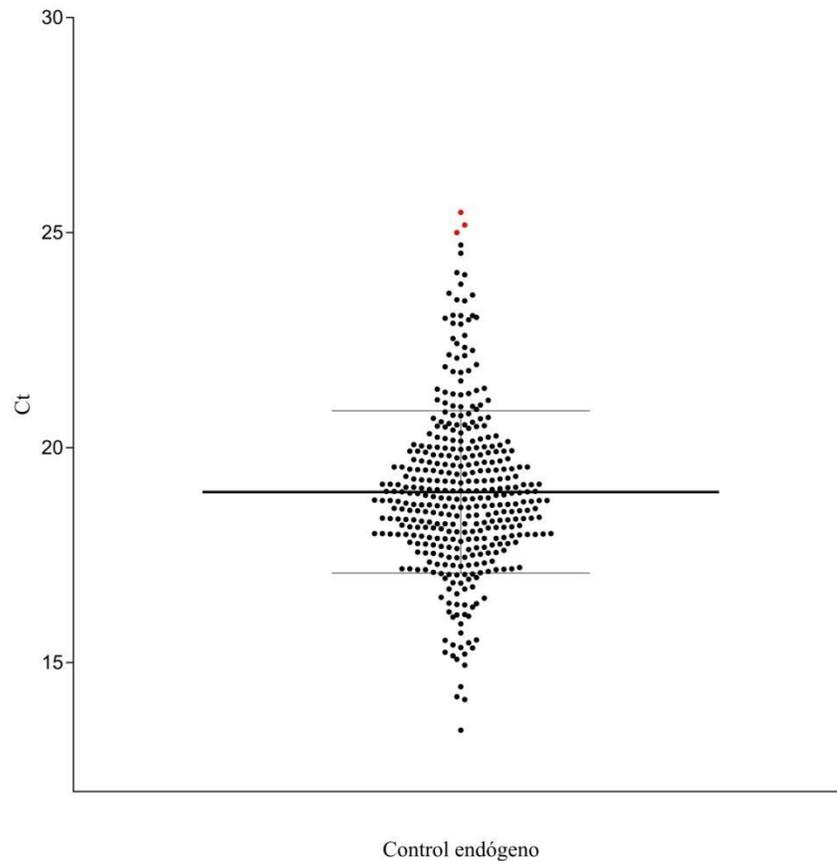


Figura 2. Diagrama de dispersión de puntos de valores de Ct del control interno endógeno. Las líneas muestran la media con la desviación estándar. Los puntos rojos indican las muestras con Ct igual o mayor a 25. Ct: ciclo umbral.

Ensayos de PCR tiempo real de ADN satelital de *T. cruzi*

De las 380 muestras, 29 fueron positivas a *T. cruzi*, constituyendo el 7,63% del total. De las 351 muestras negativas, solamente tres presentaron un bajo rendimiento en el control endógeno (Ct mayor o igual a 25). De las 29 muestras positivas, 25 fueron incuantificables (menos de 0,1 par-eq/mL), de las cuales dos presentaron bajo rendimiento del control endógeno.

Resolución del objetivo 1

Al evaluar la carga parasitaria de *T. cruzi* en la sangre de los perros del estudio se determinó un valor mínimo de $<0,1$ par-eq/mL (Ct 37,64) y un valor máximo de 0,82 par-eq/mL (Ct 31,15), una media aritmética $<0,1$ par-eq/mL (Ct 35,03), Mediana $<0,1$ par-eq/mL (Ct 35,2) y DS de 0,176 par-eq/mL (Ct $\pm 1,74$) (Fig.3).

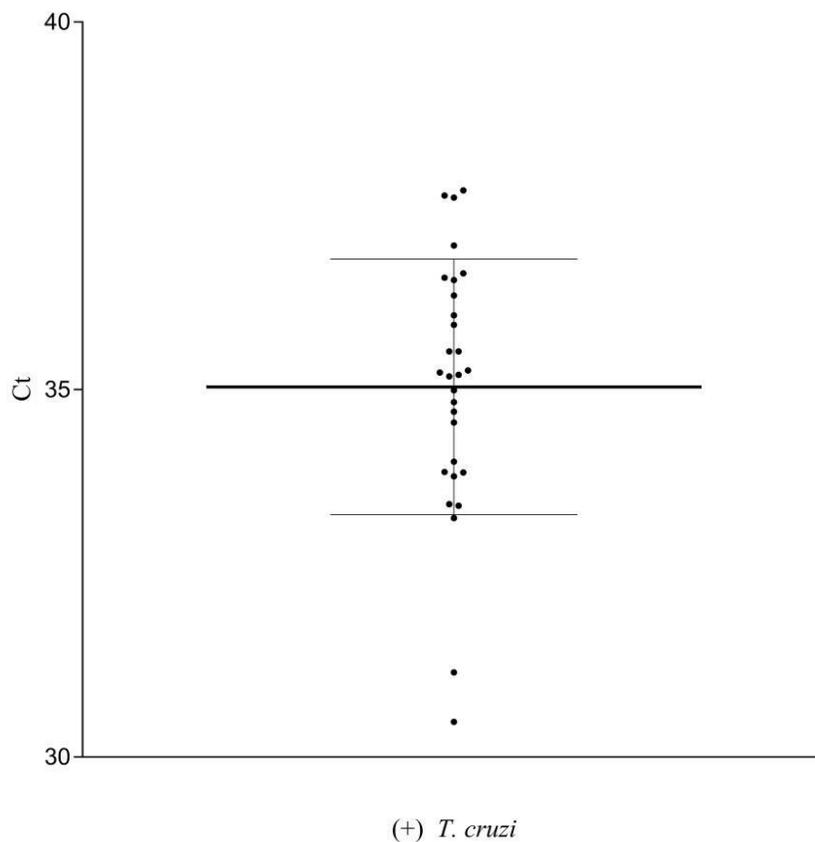


Figura 3. Diagrama de dispersión de puntos de valores de Ct de la amplificación de *Trypanosoma cruzi*. Las líneas muestran la media con la desviación estándar. Ct: ciclo umbral.

Resolución del objetivo 2

Al relacionar la presencia de *T. cruzi* con la edad, condición corporal, provincia y sexo de los perros muestreados se obtuvieron los siguientes resultados:

Edad

Respecto a la edad, fueron muestreados 128 perros entre los 0 y los 2 años, encontrándose 14 positivos (10,94%); de 128 individuos entre los 3 y 6 años, se encontraron 7 positivos (5,47%); y de 124 individuos entre 7 a 15 años, se encontraron 8 positivos (6,45%) (Fig.4). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la infección con *T. cruzi* según rango etario ($\chi^2 = 0,7748$; g.l. 2; $p = 0,6788$).

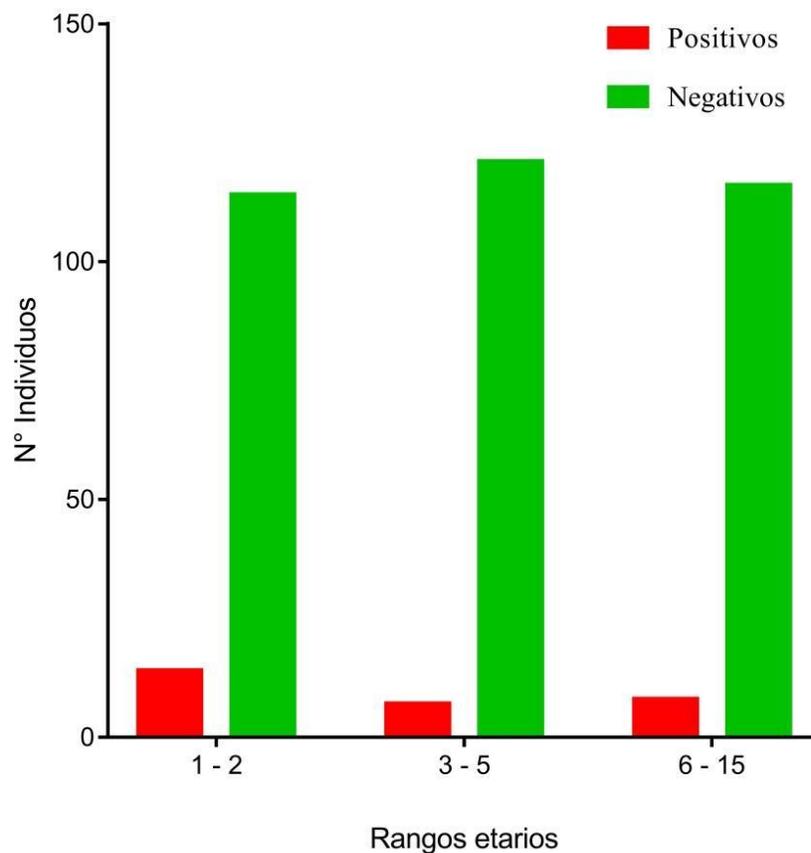


Figura 4. Presencia de *Trypanosoma cruzi* en perros de sectores rurales de la región de Coquimbo según rango etario.

Condición corporal

Respecto a la CC se muestrearon 57 individuos con baja CC, de los cuales 3 resultaron positivos (5,26%); mientras que, de 299 individuos con óptima CC resultaron 25 positivos (8,36%). Por último, de 24 individuos con alta CC resultó solamente 1 positivo (4,17%) (Fig.5). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la infección por *T. cruzi* según condición corporal de los perros ($\chi^2 = 1,088$; g.l. 2; $p = 0,5844$).

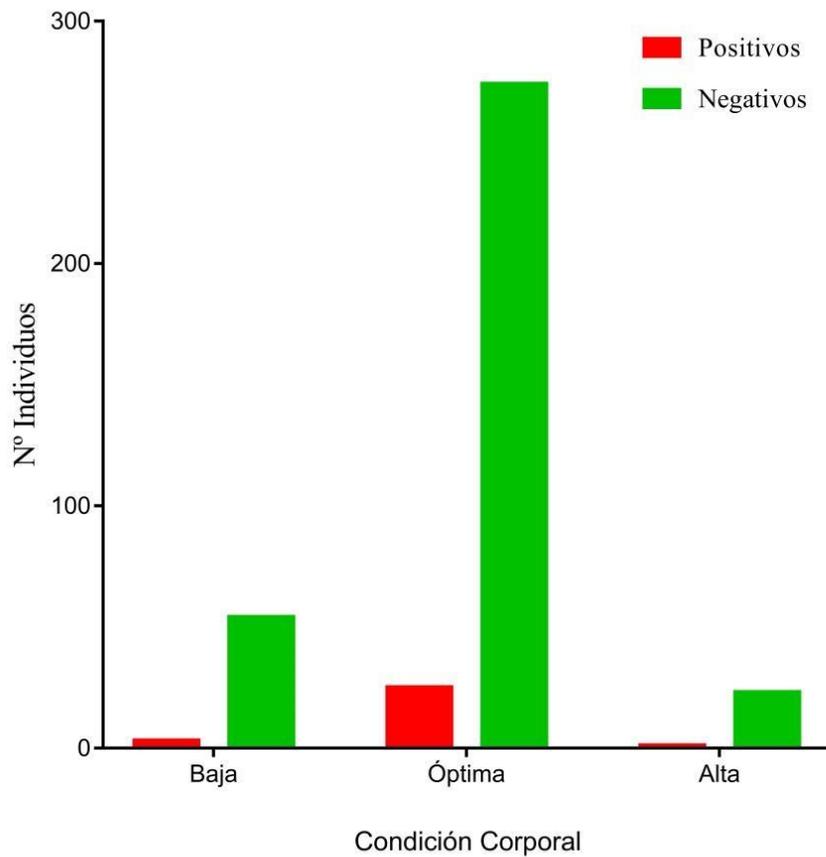


Figura 5. Presencia de *Trypanosoma cruzi* en perros de sectores rurales de la región de Coquimbo según condición corporal.

Provincia

Respecto a la localización geográfica, en la provincia de Elqui, fueron muestreados 162 individuos de los cuales 12 resultaron positivos (7,41%); en la provincia de Limarí fueron muestreados 137 individuos, de los cuales 11 resultaron positivos (8,03%); y en la provincia de Choapa fueron muestreados 81 individuos, de los cuales 6 resultaron positivos (7,41%) (Fig.6). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la infección con *T. cruzi* según provincia de muestreo ($\chi^2 = 0,04805$; g.l. 2; $p = 0,9763$).

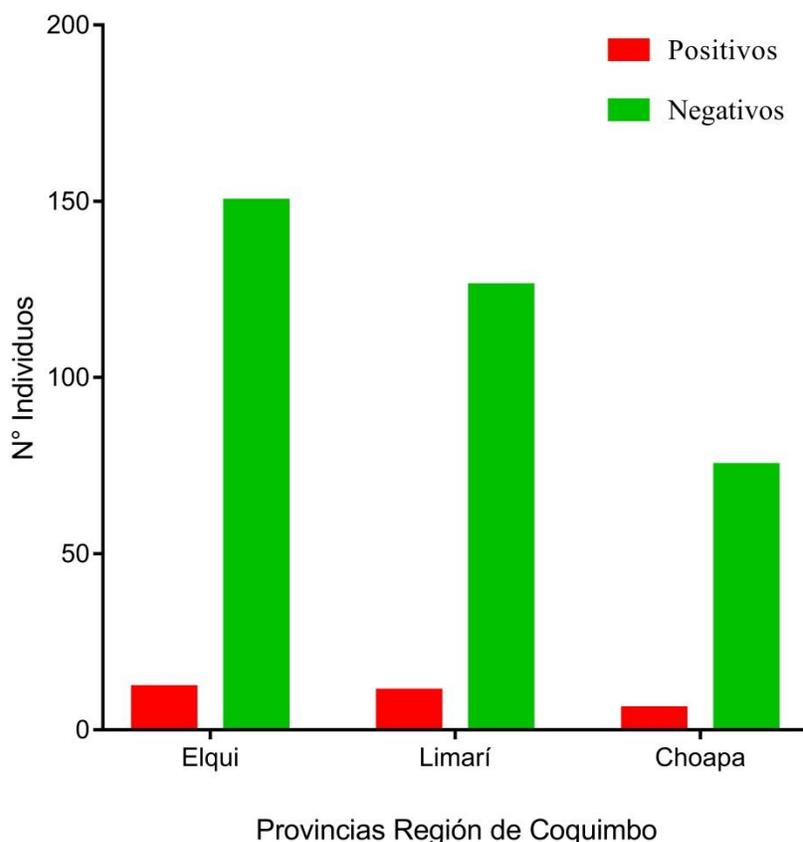


Figura 6. Presencia de *Trypanosoma cruzi* en perros de sectores rurales de la región de Coquimbo según provincia.

Sexo

Respecto al sexo de los perros, se muestrearon 92 hembras resultando 7 positivas (7,61%), mientras que los machos muestreados fueron 288 y resultaron 22 positivos (7,64%) (Fig.7). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la infección con *T. cruzi* según sexo de los perros (Test exacto de Fisher, $p=1,000$).

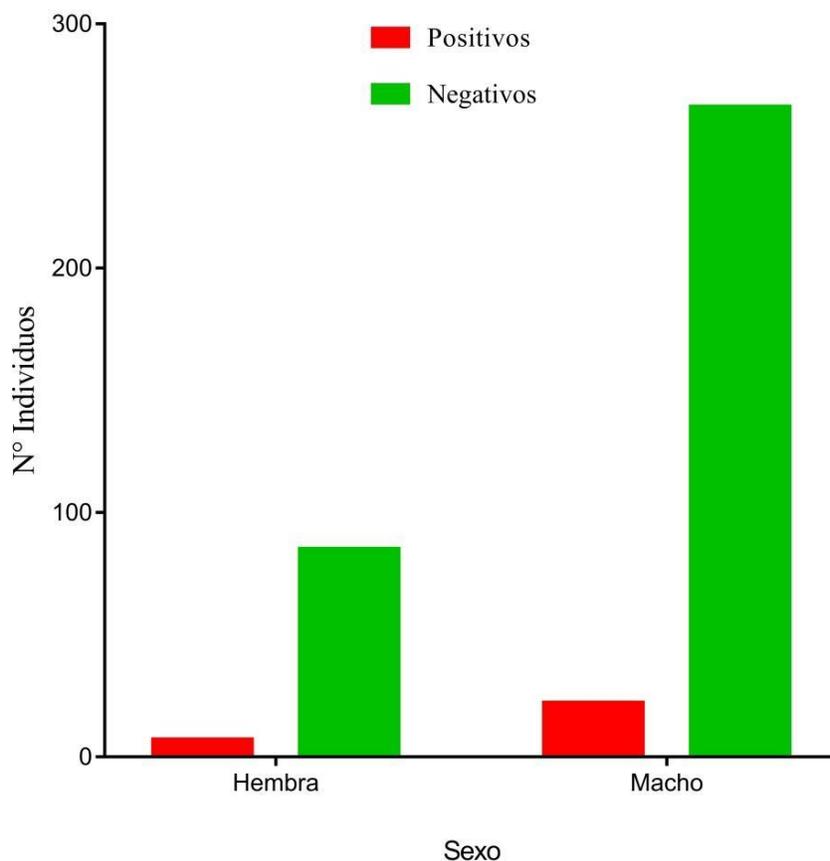


Figura 7. Presencia de *Trypanosoma cruzi* en perros de sectores rurales de la región de Coquimbo según sexo.

Resolución del objetivo 3

Para relacionar la carga parasitaria de *T. cruzi* con la edad, condición corporal, provincia y sexo de los perros positivos, se aproximaron todas las muestras incuantificables a 0,1 par-eq/mL (Tabla 1). Mediante el Test de Shapiro-Wilk se analizó la distribución de las muestras para cada variable sin evidenciar una distribución normal ($p < 0,05$), por lo que se utilizaron pruebas no paramétricas.

Edad

No hubo relación entre la edad de los perros y su carga parasitaria (Kruskal-Wallis $p=0,4284$).

Condición corporal

No hubo relación entre la CC de los perros y su carga parasitaria (Kruskal-Wallis $p=0,6642$).

Provincia

No hubo relación entre la provincia de los perros y su carga parasitaria (Kruskal-Wallis $p=0,2979$).

Sexo

Se detectaron diferencias significativas entre los sexos de los perros positivos y su carga parasitaria (Mann-Whitney $p=0,0177$).

Tabla 1. Mediana y rango de la carga parasitaria según categoría de cada variable, indicando cantidad de individuos por grupo.

		Edad	CC	Provincia	Sexo
A)	Mediana	0,1	0,1	0,1	0,1
	(Rango)	(0,100-0,107)	(0,100-0,107)	(0,100-0,818)	(0,100-0,818)
	[n]	[14]	[3]	[12]	[7]
B)	Mediana	0,1	0,1	0,1	0,1
	(Rango)	(0,100-0,116)	(0,100-0,818)	(0,100-0,116)	(0,100-0,116)
	[n]	[7]	[25]	[11]	[22]
C)	Mediana	0,1	0,1	0,1	No aplica
	(Rango)	(0,100-0,818)	(0,100)	(0,100-0,100)	
	[n]	[8]	[1]	[6]	

Edad: A) 0 - 2 años, B) 3 - 5 años, C) 6 - 15 años. Condición corporal: A) Baja, B) Óptima, C) Alta. Provincia: A) Elqui, B) Limarí, C) Choapa. Sexo: A) Hembra, B) Macho.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia y carga parasitaria de *T. cruzi* en perros de sectores rurales de la región de Coquimbo. En primer lugar, en este estudio se determinó mediante ensayos qPCR que el 7,63 % de los perros muestreados fueron positivos a *T. cruzi*. Con el mismo método, se midió la carga parasitaria de las muestras positivas y se encontró un valor máximo de 0,818 par-eq/mL y una mediana de 0,022 par-eq/mL. En un estudio similar hecho en Argentina, se encontró un valor máximo mayor a 150 par-eq/mL y una mediana de 8,1 par-eq/mL (Enriquez *et al.*, 2014), en contraste con el presente estudio, donde se encontraron niveles mucho más bajos de carga parasitaria, por lo que se sospecha que en la región de Coquimbo existirían más casos de infección crónica. Cabe mencionar que, el área de estudio de aquella investigación corresponde a una zona endémica en la cual, si bien se han realizado intervenciones vectoriales, no se ha logrado eliminar al vector y se describe como un área de “alto riesgo” (Castanera *et al.*, 1998; Enriquez *et al.*, 2014). Además, se demostró una asociación estadísticamente significativa entre la carga parasitaria y la infecciosidad de los perros (Enriquez *et al.*, 2014), lo que sugeriría que los perros de sectores rurales de la región de Coquimbo presentan una baja infecciosidad. Sin embargo, también reportaron una muestra con una carga de 0,8 par-eq/ml y que obtuvo una infecciosidad del 85 %, logrando infectar 17 de 20 vinchucas (Enriquez *et al.*, 2014). Esto último, lo podrían explicar Ferreira y colaboradores, quienes mencionan que la inconsistencia entre carga parasitaria e infecciosidad de un mismo individuo se puede deber al distinto origen sanguíneo, venoso para la PCR y capilar para el xenodiagnóstico (Ferreira *et al.*, 2007). Por otra parte, en varios estudios se tomaron muestras de 3 ml (Enriquez *et al.*, 2014; Gonzalez *et al.*, 2015; Saldana *et al.*, 2015), mientras que en el presente estudio solamente se obtuvieron 0,5 ml que finalmente se expresa en una muestra menos representativa del estado del perro y su carga parasitaria.

Respecto a la relación entre la positividad de los perros y su rango etario, en el presente estudio no hubo diferencias significativas entre las cargas parasitarias de los distintos rangos etarios. Los estudios previos en los que se evaluó la asociación entre rango etario y presencia de *T. cruzi* en sangre de perros han diferido bastante. Empezando por Lucheis y colaboradores, quienes al igual que el presente estudio no encontraron asociación estadísticamente significativa (Lucheis *et al.*, 2005). En Argentina se determinó que existe

una asociación significativa entre la edad (expresada en meses) y la infección por *T. cruzi*, encontrando un 77 % de prevalencia en los perros mayores a 48 meses (Gurtler *et al.*, 2007). Esto último, se puede deber a una mayor mortalidad en los jóvenes y a un mayor grado de resistencia relacionado con la edad de los perros (Desquesnes y De Lana, 2010). En Panamá se evaluó la infección por *T. cruzi* y *T. rangeli* en perros de sectores rurales, donde se dividió entre menores a dos años y mayores a 2 años, obteniendo como resultado que no hubo diferencias significativas entre la tasa de infección y el rango etario (Pineda *et al.*, 2011). En otro estudio realizado en Venezuela, dividieron a los perros entre 0 a 3 años, 3 a 7 años y 7 años en adelante, encontrando correlación estadística entre la edad y la infección por *T. cruzi*, donde el grupo de 0 a 3 años fue significativamente mayor al grupo de mayor edad (Berrizbeitia *et al.*, 2013). Todo esto converge en la idea que la infección por *T. cruzi* es multifactorial y que la asociación entre infección y edad del perro aún no está completamente dilucidada; sin embargo, existen varios estudios en que se menciona el aumento de probabilidad de infección a medida que aumenta la edad de los perros debido probablemente al aumento de exposición. Así, se ha descrito que por cada año de edad se incrementa 1,6 veces la probabilidad de que estén infectados por *T. cruzi* (Gurtler *et al.*, 2007; Carrillo-Peraza *et al.*, 2014; Saldana *et al.*, 2015).

Respecto a la relación entre la positividad de los perros y su condición corporal, en este estudio no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados. En un estudio hecho en Panamá se indicó que la condición corporal no fue un factor de riesgo para la seroprevalencia de *T. cruzi* en los perros estudiados (Saldana *et al.*, 2015), al igual que en Argentina, donde no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de condición corporal y la positividad de los perros (Enriquez *et al.*, 2014). Por último, el estudio en roedores que fue realizado en la Región de Coquimbo, al igual que este estudio, tampoco mostró diferencias significativas entre la condición corporal de los ejemplares infectados y los no infectados (Yefi-Quinteros *et al.*, 2018).

Respecto a la relación con las provincias, en el presente estudio no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de infección por *T. cruzi* y la provincia de origen de la muestra. Existen tres estudios recientes en humanos, cabras y micro-mamíferos respectivamente en sectores rurales de la región de Coquimbo (Gonzalez, 2012; Valenzuela, 2017; Yefi-Quinteros *et al.*, 2018). En la mayoría destaca la provincia de

Limarí como la provincia con mayor porcentaje de infección o mayor número de roedores infectados. Sin embargo, el único estudio que reveló diferencias significativas entre la frecuencia de infección y el origen de las muestras fue el estudio hecho en cabras de sectores rurales de la región de Coquimbo, en que el mayor porcentaje de infección se registró en la provincia de Limarí (Valenzuela, 2017).

Respecto a la relación entre la positividad de los perros y su sexo, no hubo diferencias estadísticamente significativas. Esto se condice con otros estudios previos en los que no se han encontrado diferencias entre la positividad de los perros y su sexo (Lucheis *et al.*, 2005; Gurtler *et al.*, 2007; Pineda *et al.*, 2011; Berrizbeitia *et al.*, 2013; Saldana *et al.*, 2015). Sin embargo, es importante mencionar que en Australia describieron que los perros machos recorren áreas significativamente más grandes que las hembras lo que sí supondría al sexo como un importante factor a pesar de que estos estudios de infección por *T. cruzi* no lo avalen (Sparkes *et al.*, 2014). Sumado a esto, al momento de toma de muestras no se registró qué lugar habitaban los perros, dentro o fuera de sus casas. Sin embargo, la mayoría parecía recorrer libremente el entorno de sus casas lo cual favorecería su infección por vectores silvestres. Por último, cabe destacar la tendencia en sectores rurales de criar machos v/s hembras (en este estudio 288/92), que se repite en varios estudios (Gurtler *et al.*, 2007; Berrizbeitia *et al.*, 2013; Saldana *et al.*, 2015).

Por otra parte, al analizar las cargas parasitarias respecto a la edad de los perros positivos, en este estudio no hubo diferencias significativas entre cargas parasitarias y grupos etarios, al igual que en un estudio en Argentina (Enriquez *et al.*, 2014).

Respecto a la condición corporal de los perros positivos, no hubo diferencias significativas entre cargas parasitarias y los distintos grupos de condición corporal, al igual que en el estudio de Yefi-Quinteros y colaboradores en el que tampoco hubo diferencias entre las cargas parasitarias y la condición corporal de los roedores positivos (Yefi-Quinteros *et al.*, 2018). Por otra parte, en Argentina encontraron que la mediana de las cargas parasitarias de los perros con baja y regular condición corporal fue cuatro veces mayor que la mediana de las cargas parasitarias de los perros con buena condición corporal; sin embargo, esas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Enriquez *et al.*, 2014).

Respecto a las cargas parasitarias y su relación con las provincias de origen de las muestras, en el presente estudio no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las provincias y las cargas parasitarias.

Por último, en este estudio sí hubo diferencias estadísticamente significativas entre las cargas parasitarias de las hembras respecto de los machos. Estos resultados no concuerdan con un estudio previo en el que se evaluaron diferencias en las cargas parasitarias según sexo de roedores positivos (Yefi-Quinteros *et al.*, 2018). Además, los perros machos al recorrer mayores distancias (Sparkes *et al.*, 2014) podrían tener mayor exposición al parásito, lo que permitiría que los machos naturalmente tengan más reinfecciones, situación que en laboratorio se ha descrito que produce alzas transitorias en la parasitemia (Machado *et al.*, 2001). Sin embargo, en este estudio las hembras tuvieron las mayores cargas. Esto se podría explicar debido al bajo número de individuos positivos (7 hembras y 22 machos) y que dentro de las siete muestras positivas hembras se encuentran tres de las cuatro muestras del estudio que dieron cargas parasitarias superiores a 0,1 par-eq/mL.

Los resultados actuales muestran que existen perros positivos a *T. cruzi* en todas las localidades muestreadas indicando la existencia del parásito y con ello, una mayor probabilidad de infección por parte de los humanos que habitan estas zonas rurales. Por otra parte, las cargas parasitarias estudiadas fueron bajas por lo que se presume que cursaban infecciones crónicas al momento de la toma de muestra. Además, ningún perro superaba los 15 años por lo que fueron infectados después de la interrupción vectorial declarada en 1999. Existe cierto riesgo que esta transmisión haya sido vectorial por lo que se recomienda mantener a los perros dentro o fuera del hogar pero no en ambos espacios.

CONCLUSIONES

- En este estudio, en perros de sectores rurales de la región de Coquimbo, se detectó un bajo porcentaje de positividad a *T. cruzi* con bajas parasitemias en comparación con regiones endémicas de países sin control vectorial.
- En estos sectores, no se encontraron diferencias significativas entre el estatus de infección y la edad, condición corporal, provincia y sexo de los perros muestreados.
- Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la carga parasitaria y la edad, condición corporal y provincia de los perros positivos muestreados.
- Se detectó una diferencia entre las cargas parasitarias y el sexo de los ejemplares positivos, siendo mayor en hembras. Esto, posiblemente debido al bajo número de individuos positivos.

BIBLIOGRAFÍA

APT, W.; ZULANTAY, I.; ARNELLO, M.; ODDO, D.; GONZALEZ, S.; RODRIGUEZ, J.; KEMMERLING, U.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y. 2013. Congenital infection by *Trypanosoma cruzi* in an endemic area of Chile: a multidisciplinary study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 107: 98-104.

ARCE-FONSECA, M.; CARRILLO-SANCHEZ, S. C.; MOLINA-BARRIOS, R. M.; MARTINEZ-CRUZ, M.; CEDILLO-COBIAN, J. R.; HENAO-DIAZ, Y. A.; RODRIGUEZ-MORALES, O. 2017. Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in domestic dogs from Sonora, Mexico. *Infect. Dis. Poverty.* 6: 120.

BACIGALUPO, A.; SEGURA, J. A.; GARCIA, A.; HIDALGO, J.; GALUPPO, S.; CATTAN, P. E. 2006. First finding of Chagas disease vectors associated with wild bushes in the Metropolitan Region of Chile. *Rev. Med. Chil.* 134: 1230-1236.

BERRIZBEITIA, M.; CONCEPCION, J. L.; CARZOLA, V.; RODRIGUEZ, J.; CACERES, A.; QUINONES, W. 2013. Seroprevalence of *T-cruzi* infection in *Canis familiaris*, state of Sucre, Venezuela. *Biomedica.* 33: 214-225.

CANALS, M.; CACERES, D.; ALVARADO, S.; CANALS, A.; CATTAN, P. E. 2017. Modeling Chagas disease in Chile: From vector to congenital transmission. *Biosystems.* 156-157: 63-71.

CANALS, M.; SOLÍS, R.; TAPIA, C.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P. E. 1999. Comparison of some behavioral and physiological feeding parameters of *Triatoma infestans* Klug, 1834 and *Mepraia spinolai* Porter, 1934, vectors of Chagas disease in Chile. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94: 687-692.

CARRILLO-PERAZA, J. R.; MANRIQUE-SAIDE, P.; RODRIGUEZ-BUENFIL, J. C.; ESCOBEDO-ORTEGON, J. F.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; BOLIO-GONZALEZ, M. E.; BARRERA-PEREZ, M.; REYES-NOVELO, E.; SAURI-ARCEO, C. H. 2014. Serological study of *Trypanosoma cruzi* and associated factors in dogs from a rural community of Yucatan, Mexico. *Archivos De Medicina Veterinaria.* 46: 75-81.

- CASTANERA, M. B.; LAURICELLA, M. A.; CHUIT, R.; GURTLER, R. E.** 1998. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-western Argentina. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 92: 671-683.
- CASTILLO, D.; WOLFF, M.** 2000. Aspectos del comportamiento de los triatominos (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Biomédica.* 20: 59-64.
- CORREA, V.; BRICEÑO, J.; ZUÑIGA, J.; ARANDA, J.; VALDES, J.; CONTRERAS, M.; SCHENONE, H.; VILLAROEL, F.; ROJAS, A.** 1982. Infección 21 por *Trypanosoma cruzi* en animales domésticos de sectores rurales de la IV Región, Chile. *Bol. Chile Parasit.* 37: 27-28.
- CRUZ-CHAN, J. V.; BOLIO-GONZALEZ, M.; COLIN-FLORES, R.; RAMIREZ-SIERRA, M. J.; QUIJANO-HERNANDEZ, I.; DUMONTEIL, E.** 2009. Immunopathology of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Vet. Parasitol.* 162: 151-155.
- DESQUESNES, M.; DE LANA, M.** 2010. Veterinary aspects and experimental studies. In: Telleria, J.; Tibayrenc, M. (Eds.), *American trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research.* ; Burlington, London. pp 277-318.
- DUFFY, T.; BISIO, M.; ALTICHEH, J.; BURGOS, J. M.; DIEZ, M.; LEVIN, M. J.; FAVALORO, R. R.; FREILIJ, H.; SCHIJMAN, A. G.** 2009. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3: e419.
- DUFFY, T.; CURA, C. I.; RAMIREZ, J. C.; ABATE, T.; CAYO, N. M.; PARRADO, R.; BELLO, Z. D.; VELAZQUEZ, E.; MUNOZ-CALDERON, A.; JUIZ, N. A.; BASILE, J.; GARCIA, L.; RIARTE, A.; NASSER, J. R.; OCAMPO, S. B.; YADON, Z. E.; TORRICO, F.; DE NOYA, B. A.; RIBEIRO, I.; SCHIJMAN, A. G.** 2013. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: e2000.

EICKHOFF, C. S.; DUNN, B. A.; SULLIVAN, N. L.; HOFT, D. F. 2013. Comparison of the infectivity of *Trypanosoma cruzi* insect-derived metacyclic trypomastigotes after mucosal and cutaneous contaminative challenges. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 108: 508-511.

ENRIQUEZ, G. F.; BUA, J.; OROZCO, M. M.; WIRTH, S.; SCHIJMAN, A. G.; GURTLER, R. E.; CARDINAL, M. V. 2014. High levels of *Trypanosoma cruzi* DNA determined by qPCR and infectiousness to *Triatoma infestans* support dogs and cats are major sources of parasites for domestic transmission. Infect. Genet. Evol. 25: 36-43.

FERREIRA, R.; LAZZARI, C.; LORENZO, M.; PEREIRA, M. 2007. Do Haematophagous Bugs Assess Skin Surface Temperature to Detect Blood Vessels? PLoS One. 2: e932.

GONZALEZ, C. R.; REYES, C.; CANALS, A.; PARRA, A.; MUNOZ, X.; RODRIGUEZ, K. 2015. An entomological and seroepidemiological study of the vectorial-transmission risk of Chagas disease in the coast of northern Chile. Medical and Veterinary Entomology. 29: 387-392.

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 para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 33p.

GUEDES, P. M. M.; VELOSO, V. M.; CALIARI, M. V.; CARNEIRO, C. M.; SOUZA, S. M.; DE LANA, M.; CHIARI, E.; BAHIA, M. T.; GALVAO, L. M. C. 2007. *Trypanosoma cruzi* high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 102: 141-147.

GURTLER, R. E.; CARDINAL, M. V. 2015. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. 151: 32-50.

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.

- IENNE, S.; PEDROSO, A.; CARMONA, E. F. R.; BRIONES, M. R.; ZINGALES, B.** 2010. Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. *Inf. Genet. Evol.* 10: 601-606.
- KOOY, R. F.; ASHALL, F.; VAN DER PLOEG, M.; OVERDULVE, J. P.** 1989. On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36: 73-76.
- LARRONDO, G.** 2017. Presencia de *Trypanosoma cruzi* en caninos de la comuna de Til-Til, Región Metropolitana. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Biológicas Animales. 36p.
- LUCHEIS, S. B.; DA SILVA, A.; ARAUJO, J. P.; 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. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 11: 492-509.
- MACHADO, E. M.; FERNANDES, A. J.; MURTA, S. M.; VITOR, R. W.; CAMILO, D. J., JR.; PINHEIRO, S. W.; LOPES, E. R.; ADAD, S. J.; ROMANHA, A. J.; PINTO DIAS, J. C.** 2001. A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 65: 958-965.
- MARTINEZ, I.; CERVANTES-LANDIN, A.; ESPINOZA, B.** 2013. [Molecular diagnosis of Chagas disease]. *Gaceta médica de Mexico.* 149: 363-365.
- 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.
- MOREIRA, O. C.; RAMIREZ, J. D.; VELAZQUEZ, E.; MELO, M. F.; LIMA-FERREIRA, C.; GUHL, F.; SOSA-ESTANI, S.; MARIN-NETO, J. A.; MORILLO, C. A.; BRITTO, C.** 2013. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop.* 125: 23-31.
- MUÑOZ, C.; ZULANTAY, I.; APT, W.; ORTIZ, S.; SCHIJMAN, A. G.; BISIO, M.; FERRADA, V.; HERRERA, C.; MARTINEZ, G.; SOLARI, A.** 2013. Evaluation of

nifurtimox treatment of chronic Chagas disease by means of several parasitological methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 4518-4523.

PINEDA, V.; SALDANA, A.; MONFANTE, I.; SANTAMARIA, A.; GOTTDENKER, N. L.; YABSLEY, M. J.; RAPOPORT, G.; CALZADA, J. E. 2011. Prevalence of trypanosome infections in dogs from Chagas disease endemic regions in Panama, Central America. *Vet. Parasitol.* 178: 360-363.

PIRON, M.; FISA, R.; CASAMITJANA, N.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; PUIG, L.; VERGÉS, M.; GASCÓN, J.; GÓMEZ I PRAT, J.; PORTÚS, M.; SAULEDA, S. 2007. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 103: 195-200.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. 2010. Chagas disease. *Lancet.* 375: 1388-1402.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious disease clinics of North America.* 26: 275-291.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN NETO, J. A. 2015. Chagas Disease. *Neglected Tropical Diseases - Latin America and the Caribbean.* 45-71.

RIAL, M. S.; SCALISE, M. L.; ARRUA, E. C.; ESTEVA, M. I.; SALOMON, C. J.; FICHERA, L. E. 2017. Elucidating the impact of low doses of nano-formulated benznidazole in acute experimental Chagas disease. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 11: e0006119.

RIOS, A.; ALCAINO, H.; APT, W. 1986. Enfermedad de Chagas en caninos, bovinos y équidos sinantropicos, de la Provincia del Limarí, Chile. *Parasitol al Día.* 10: 40-45.

ROSAS, A. C.; OJEDA, G. P.; BARRIOS, A.; OTTEO, M.; MARUÑAK, S. L. 2016. Tripanosomiasis americana en un canino del nordeste argentino. Reporte del caso clínico. *Rev. Vet.* 27(1): 62-65.

RUSSELL, R. C.; OTRANTO, D.; WALL, R. 2013. Kissing bugs. *In: The encyclopedia of medical and veterinary entomology.* UK. pp 177-184.

SALDANA, A.; CALZADA, J. E.; PINEDA, V.; PEREA, M.; RIGG, C.; GONZALEZ, 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: 936-944.

SCHENONE, H.; CONTRERAS, M. C.; BORGONO, J. M.; MATURANA, R.; SALINAS, P.; SANDOVAL, L.; ROJAS, A.; TELLO, P.; VILLARROEL, F. 1991. Overview of the epidemiology of Chagas' disease in Chile. Bol. Chil. Parasitol. 46: 19-30.

SPARKES, J.; KORTNER, G.; BALLARD, G.; FLEMING, P. J.; BROWN, W. Y. 2014. Effects of sex and reproductive state on interactions between free-roaming domestic dogs. PLoS One. 9: e116053.

STASSEN, Q. E.; RIEMERS, F. M.; REIJMERINK, H.; LEEGWATER, P. A.; PENNING, L. C. 2015. Reference genes for reverse transcription quantitative PCR in canine brain tissue. BMC Res. Notes. 8: 761.

VALENZUELA, D. 2017. Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en caprinos asociados a viviendas rurales de la Región de Coquimbo. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Biológicas Animales. 34p.

WALECKX, E.; SUAREZ, J.; RICHARDS, B.; DORN, P. L. 2014. *Triatoma sanguisuga* blood meals and potential for Chagas disease, Louisiana, USA. Emerg. Infect. Dis. 20: 2141-2143.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 2017. Chagas disease (American trypanosomiasis). [en línea] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. [consulta 11-03-2018].

YEFI-QUINTEROS, E.; MUNOZ-SAN MARTIN, C.; BACIGALUPO, A.; CORREA, J. P.; CATTAN, P. E. 2018. *Trypanosoma cruzi* load in synanthropic rodents from rural areas in Chile. Parasites & vectors. 11: 171.

ANEXO N°1: CERTIFICADO DE BIOÉTICA



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°2: CERTIFICADO DE BIOSEGURIDAD



CERTIFICADO N° 29

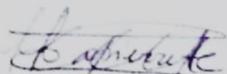
Santiago 07 de Octubre de 2013

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

