

**Universidad Nacional
Escuela de Medicina Veterinaria
Facultad de Ciencias de la Salud**

**Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en perros
de dos zonas rurales con altos y bajos índices de infestación por
*Triatoma dimidiata***

Modalidad: Tesis

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico
de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

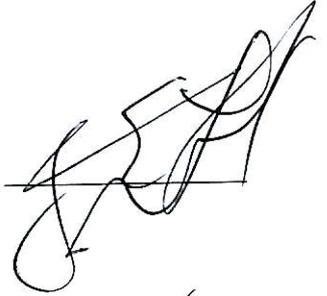
Adriana Villegas Corea

**Campus Presbítero Benjamín Núñez
2008**

Hoja de aprobación del Tribunal Examinador**Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en perros de dos zonas rurales con altos y bajos índices de infestación por *Triatoma dimidiata***

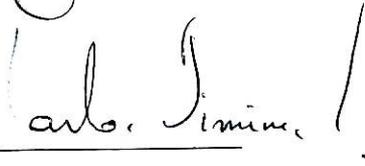
Dr. Jorge Quirós (Decano)

Firma



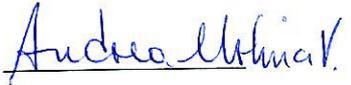
Dr. Carlos Fco. Jiménez (Director)

Firma



Dra. Andrea Urbina (Tutora)

Firma



Dra. Jacqueline B. de Oliveira (Lectora)

Firma



Dr. Rodrigo Zeledón (Lector)

Firma



Fecha 2008

INDICE DE CONTENIDOS

| | Páginas |
|---|---------|
| INDICE DE CONTENIDOS | III |
| INDICE DE CUADROS | V |
| INDICE DE FIGURAS | VI |
| ABREVIATURAS | VII |
| RESUMEN | VIII |
| ABSTRACT | IX |
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 1.1 OBJETIVOS | 5 |
| 1.1.1 OBJETIVO GENERAL | 5 |
| 1.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS | 5 |
| 2. METODOLOGIA: MATERIALES Y METODOS | 6 |
| 2.1 AREAS DE ESTUDIO | 6 |
| 2.2. ABORDAJE A NIVEL COMUNAL | 9 |
| 2.3 SELECCION DE LOS HOGARES | 9 |
| 2.4 SELECCIÓN DE LOS ANIMALES | 9 |
| 2.5 EXAMEN DE LOS ANIMALES | 10 |
| 2.6 OBTENCION DE LA MUESTRA DE SANGRE | 10 |
| 2.7 TRANSPORTE DE LA MUESTRA | 10 |
| 2.8 ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA | 10 |
| 2.9 PRUEBA DE HAMAGLUTINACION INDIRECTA (HAI) | 10 |

| | |
|---|----|
| 2.10 PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INIRECTA (IFI) | 12 |
| 2.11 SEGUIMIENTO DE LAS ESTRATEGIAS DE CONTROL ECOLOGICO PARA <i>T. dimidiata</i> | 14 |
| 2.12 RECOLECTA DE CHINCHES | 16 |
| 2.13 ELECTROCARDIOGRAMA | 16 |
| 2.14 COEFICIENTE KAPPA O PRUEBA DE CONCORDANCIA | 16 |
| 2.15 EVALUACION DE IFI VERSUS HAI | 17 |
| 2.16. SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA | 17 |
| 3. RESULTADOS | 18 |
| 3.1 RESULTADOS SEROLOGICOS | 18 |
| 3.2 RESULTADOS DE LOS ELECTROCARDIOGRAMAS | 22 |
| 3.3 RESULTADO DE COEFICIENTE KAPPA O PRUEBA DE CONCORDANCIA | 23 |
| 3.4 RESULTADO DE LA EVALUACION DE IFI VERSUS HAI | 24 |
| 3.5 RESULTADO DE LA PRUEBA DE HIPÓTESIS | 25 |
| 3.6 RESULTADOS DE LA RECOLECTA DE CHINCHES Y DEL CONTROL ECOLOGICO | 25 |
| 4. DISCUSION | 27 |
| 5. CONCLUSIONES | 31 |
| 6. RECOMENDACIONES | 32 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 33 |
| 8. ANEXOS | 36 |

INDICE DE CUADROS

| | Páginas |
|---|---------|
| Cuadro 1: Prevalencia de anticuerpos contra <i>Trypanosoma cruzi</i> en perros de dos zonas endémicas de Costa Rica | 18 |
| Cuadro 2: Título y sexo de los animales seropositivos a HAI y/o IFI | 19 |
| Cuadro 3: Detalle de los electrocardiogramas | 22 |
| Cuadro 4: Índice Kappa | 23 |
| Cuadro 5: Evaluación de IFI versus HAI | 24 |
| Cuadro 6: Condición actual de las 20 casas sometidas a control ecológico, 4 y 3 años después de haber realizado las modificaciones ambientales | 26 |

INDICE DE FIGURAS

| | Páginas |
|---|---------|
| Figura 1: Distribución de casas positivas para <i>T. dimidiata</i> en la zona de Vuelta de Jorco en Aserri. | 7 |
| Figura 2: Distribución de casas positivas para <i>T. dimidiata</i> en la zona de Cuatro Esquinas de Santa Cruz. | 8 |
| Figura 3: Distribución de las casas de barrio “El Pilar” sometidas a intervenciones ambientales. | 15 |
| Figura 4: Distribución por edad de animales positivos a la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta para la detección de anticuerpos contra <i>T. cruzi</i> . | 21 |
| Figura 5: Distribución por edad de animales positivos a la prueba de Hemaglutinación Indirecta para la detección de anticuerpos contra <i>T. cruzi</i> . | 21 |

ABREVIATURAS

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta

HAI: Hemaglutinación Indirecta

EOG: Examen Objetivo General

Ag: Antígeno

Ac: Anticuerpo

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

ECG: Electrocardiograma

mm: Milímetro

sec: Segundo

cm: Centímetro

mV: Milivoltio

l/min: Latidos por minuto

AV: Atrioventricular

r.p.m: Revoluciones por minuto

g: Gravedades

Se: Sensibilidad de una prueba diagnóstica serológica

Sp: Especificidad de una prueba diagnóstica serológica

VP +: Valor predictivo positivo

VP -: Valor predictivo negativo

RESUMEN

Un total de 91 perros provenientes de dos zonas rurales de Costa Rica, con edades entre los dos meses hasta los 10 años fue sangrado y sometido a dos pruebas serológicas: Hemaglutinación indirecta e Inmunofluorescencia indirecta, para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Las zonas elegidas fueron Barrio Pilar en Vuelta de Jorco, localizado en Aserrí, San José y Barrio Cuatro Esquinas ubicado en Santa Cruz de Guanacaste. En la localidad de Barrio Pilar fueron elegidos 20 hogares, mientras que en Cuatro Esquinas fueron 23. Se demostró una seroprevalencia general de 10.99%; sin embargo, la zona de mayor positividad fue Vuelta de Jorco, en la provincia de San José con 19.35%, en Santa Cruz de Guanacaste la seroprevalencia fue de 6.67%. Los 5 animales seropositivos de Barrio Pilar fueron sometidos a un electrocardiograma para evaluar si existía algún grado de compromiso cardíaco, sólo un animal presentó alteraciones en esta prueba. También se evaluaron las medidas de control ecológico para *T. dimidiata*, en los mismos 20 hogares de Barrio Pilar, los cuales fueron seleccionados en un estudio previo realizado en el año 2004. Este seguimiento se realizó para determinar si las personas aún mantenían las modificaciones ambientales instauradas tres años antes o si habían retomado el hábito de colocar la leña, basura y otros desechos en lugares no apropiados que favorecen la colonización y multiplicación de los chinches. Después de una revisión minuciosa en los 20 hogares, en dos (5.4%) se detectó la infestación peridomiciliar por *T. dimidiata*. La búsqueda de chinches se realizó también en 17 hogares de Cuatro Esquinas, sin embargo no fue posible encontrar estos insectos.

ABSTRACT

A total of 91 dogs from two rural villages of Costa Rica, with ages between 2 months and 10 years old, were bled and submitted to two serological tests: Indirect Hemagglutination and Indirect Immunofluorescence, in order to diagnose Chagas Disease. The chosen areas were "Barrio Pilar" in Vuleta de Jorco located in Aserri, San José and "Barrio Cuatro Esquinas" in Santa Cruz, Guanacaste. In "Barrio Pilar" 20 hoses were selected while in "Cuatro Esquinas" where 23. An overall positivity of 10.99% was demonstrated. The highest positivity was found in the village of Vuelta de Jorco with 19.35%, while the lowest was found in the province of Guanacaste with 6.67%. An electrocardiogram was performed in 5 positive dogs of "Barrio Pilar" to assess whether there was any degree of heart damage, only one dog presented alterations. Also, the environmental modifications for the control of *T. dimidiata* were evaluated in the same 20 houses of "Barrio Pilar" which were selected in a previous study in 2004. This follow up was performed in order to evaluate if even four years after the neighbours still maintained the environmental modifications or if they retake the habit of placing piles of firewood, trash and other waste materials in inappropriate places favouring the colonization and proliferation of bugs. Two of de houses (5.4%) were positive for *T. dimidiata*, the bugs were collected around households. The recollection of bugs was also conducted in 17 households from Santa Cruz, however it was not possible to find these vectors.

1. INTRODUCCION

Actualmente, la enfermedad de Chagas se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina. Afecta principalmente a personas de escasos recursos que viven en zonas rurales bajo condiciones que favorecen el alojamiento de los insectos vectores (WHO, 1991; Schmuñis, 1991) (Anexo I).

La principal vía de transmisión es la vectorial a través de insectos hematófagos conocidos en Costa Rica como chinches. En nuestro país el principal vector identificado es el *Triatoma dimidiata* (Zeledón et al., 1975).

T. dimidiata pertenece al Phylum Artropoda, Clase Insecta, Orden Hemiptera, Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae. Poseen un par de alas, un órgano picador muy característico dividido en tres partes y se alimentan exclusivamente de sangre de vertebrados (Bowman, 2003).

El agente causal de esta enfermedad recibe el nombre de *Trypanosoma cruzi*, un protozooario hemoflagelado, de forma alargada, que posee un núcleo ubicado al centro, con un solo flagelo que surge en el cinetoplasto, el cual presenta las características de una mitocondria y contiene gran cantidad de ADN. Durante su desarrollo tanto en huéspedes mamíferos como en los insectos, este tripanosoma se somete a cambios considerables, donde se distinguen tres tipos morfológicos: el amastigoto; que carece de flagelo, el tripomastigoto y el epimastigoto, donde cada forma se reconoce de acuerdo con la ubicación de su flagelo (Bowman, 2003).

El ciclo de transmisión se inicia cuando el insecto vector se alimenta de sangre de un huésped infectado, ingiriendo tripomastigotos sanguíneos y en su tubo digestivo se multiplican y transforman en tripomastigotos metacíclicos, que posteriormente son eliminados en las heces

(Zeledón et al., 1975; Zeledón, 1996; Sherlock, 2000). Estas formas infectantes penetran los tejidos por abrasiones de la piel, y directamente a través de membranas mucosas como conjuntiva (Schmuñis, 1991) (Anexo II).

Una vez dentro del huésped los tripomastigotos metacíclicos se transforman en amastigotos que se multiplican por fisión binaria en las células de los mamíferos, incluyendo tejido reticuloendotelial, neural y glial, cardiaco y músculo liso. Los amastigotos son liberados por la ruptura de las células y sufren su cambio a tripomastigotos sanguíneos, los cuales circulan infectando otras células y es en esta fase donde pueden ser ingeridos por otros triatóminos mientras se alimentan (Bowman, 2003) (Anexo III).

Desde el punto de vista epidemiológico, se reconocen tres ciclos de transmisión vectorial. El ciclo selvático involucra triatomas silvestres que infectan roedores, marsupiales y otros animales que actúan como reservorios. En el ciclo doméstico el vector se ha adaptado a las viviendas e involucra humanos y animales como perros y gatos, ocurre mayormente en hogares rurales. En el ciclo peridomiciliar participan mamíferos (marsupiales, perros y gatos) e insectos silvestres adaptados a ecotopos artificiales; este ciclo actúa como lazo entre el ciclo selvático y el domiciliario (Schmuñis, 1991).

Zeledón et al., (1975) determinaron que el tipo de transmisión que predominaba en nuestro país era el intradomiciliar. Sin embargo, hoy en día se considera peridomiciliar, esto gracias a la evolución socioeconómica de los últimos 30 años, que paulatinamente ha generado mejoras en la construcción de viviendas, lo que disminuye las posibilidades del vector de colonizar lugares dentro del hogar (Zeledón et al., 2001). Además, *T. dimidiata* es más lento y más tímido que otras especies de chinches y se acerca al hombre accidentalmente, atraído por las luces y/o por la necesidad de alimento (Zeledón et al., 1970b; Zeledón, 1976). Otras vías

de transmisión son: la congénita (Azogue et al., 1985), por transfusión de sangre (Ponce & Ponce, 1999), accidentes de laboratorio (Hofflin et al., 1987) y por vía oral (Dias, 2000).

En Costa Rica, se ha determinado que el vector puede encontrarse en hogares, refugios de animales domésticos (Zeledón & Vargas, 1984), áreas arbustivas en la mayoría de nuestros parques nacionales y en otras áreas de conservación (Zeledón et al., 2001), pero es más abundante en regiones montañosas y tierras altas en el centro del país (Zeledón et al., 1970a).

Se han reportado altos índices de prevalencia serológica para *T. cruzi* (mayores al 50%) en perros de áreas rurales de Argentina, Venezuela y Bolivia (Wisnivesky-Colli et al., 1985). En Chile el porcentaje de seropositividad para esta enfermedad es del 9.3 % en perros de áreas endémicas (Rojas et al., 1973).

Varios estudios demuestran que en nuestro país las tasas de morbilidad canina son altas. En un estudio realizado por Zeledón et al., (1975), se sometieron a xenodiagnóstico 253 perros de una zona endémica para la enfermedad de Chagas, 25 de ellos (9.8%) resultaron positivos. Por otro lado, Montenegro et al., (2002) seleccionaron 54 perros de hogares donde se habían encontrado chinches, 15 de estos animales (27.7%) estaban infectados con *T. cruzi*. Además, Reyes et al., (2002) analizaron 116 sueros de perros de zonas endémicas y 70 sueros de zonas no endémicas para la enfermedad. La seropositividad fue de 5.2% y 1.6% respectivamente.

Se considera que los perros se infectan de la misma manera que los humanos; sin embargo, su instinto de tomar el insecto con la boca y masticarlo, representa un mecanismo de infección mucho más efectivo (Zeledón et al., 2001). Luego se presenta la fase aguda que puede ser fatal en animales jóvenes, y una fase crónica con patrones de cardiopatías (Barr et al., 1991; Montenegro et al., 2002).

El perro juega un papel muy importante en la transmisión de *T. cruzi* domiciliar, ya que se ha demostrado que es un reservorio altamente infectivo para el vector (Gürtler et al., 1991). Un estudio realizado por Gürtler et al., (1998) reveló que el índice de infección del vector con el parásito aumenta con respecto al número de perros infectados.

En nuestro país, el porcentaje de infección de los insectos vectores con el parásito *T. cruzi* oscila entre un 30 y un 36% en viviendas de determinadas zonas rurales (Zeledón & Rojas, 2006). Esto asociado a que *T. dimidiata* tiene una alta predilección por la sangre de perro para su alimentación (Zeledón et al., 1973; Calderón et al., 2001; Zeledón et al., 2005) revela que es importante conocer si estos animales han estado en contacto con el parásito y cuál es la tasa de infección.

Por otra parte, un estudio de Zeledón & Rojas (2006) demostró que los altos índices de infestación con el *T. dimidiata* en ciertas zonas rurales o semirurales del país, se asocian con la presencia de ecotopos artificiales que propician la colonización y multiplicación del insecto alrededor de las viviendas, y que eliminando estos refugios se logra reducir los índices de infestación (Anexo IV). Por lo tanto, es importante conocer el grado de cumplimiento de las intervenciones ambientales introducidas en el año 2004 y que se tradujeron en la reducción y desaparición de los vectores en las casas intervenidas (Zeledón & Rojas, 2006).

El estudio propuesto permitió conocer la seroprevalencia de infección y el estado de salud de los perros de casas ubicadas en áreas rurales con altos y bajos índices de infestación. Los resultados pueden tomarse como indicadores del grado de exposición a vectores infectados al que están sujetos los perros de las zonas sometidas al estudio.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Determinar la seroprevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi* en perros de dos zonas rurales con altos y bajos índices de infestación por *Triatoma dimidiata*.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Establecer la seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en perros utilizando las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y hemaglutinación indirecta (HAI).
2. Comparar la seroprevalencia de infección en perros de las dos zonas sometidas al estudio; una con altos índices de infestación por *Triatoma dimidiata* y otra con bajos índices.
3. Dar seguimiento a las estrategias de control ecológico de *T. dimidiata*, divulgadas como parte de un plan piloto para la eliminación del vector.

2. METODOLOGIA: MATERIALES Y METODOS

2.1 Áreas de estudio: Santa Cruz de Guanacaste; en el distrito Lagunilla, “Barrio Cuatro Esquinas” (10°15’29’’ Norte y 85°31’08’’ Oeste con una altitud de 49 metros), y en Aserri provincia de San José, distrito Vuelta de Jorco, “Barrio Pilar” (09°47’52’’ Norte y 84°07’55’’ Oeste con una altitud de 1120 metros) (Figuras 1 y 2). Ambas zonas han sido previamente determinadas como endémicas para la enfermedad; sin embargo, la localidad de “Barrio Pilar” presentó un mayor número de casas infestadas en el interior y en el peridomicilio así como un mayor número de insectos positivos a *T. cruzi*. Mientras que “Cuatro Esquinas” presentó un nivel de infestación intra y peridomiciliar menor así como un menor número de insectos infectados (Zeledón, 2001a y b).

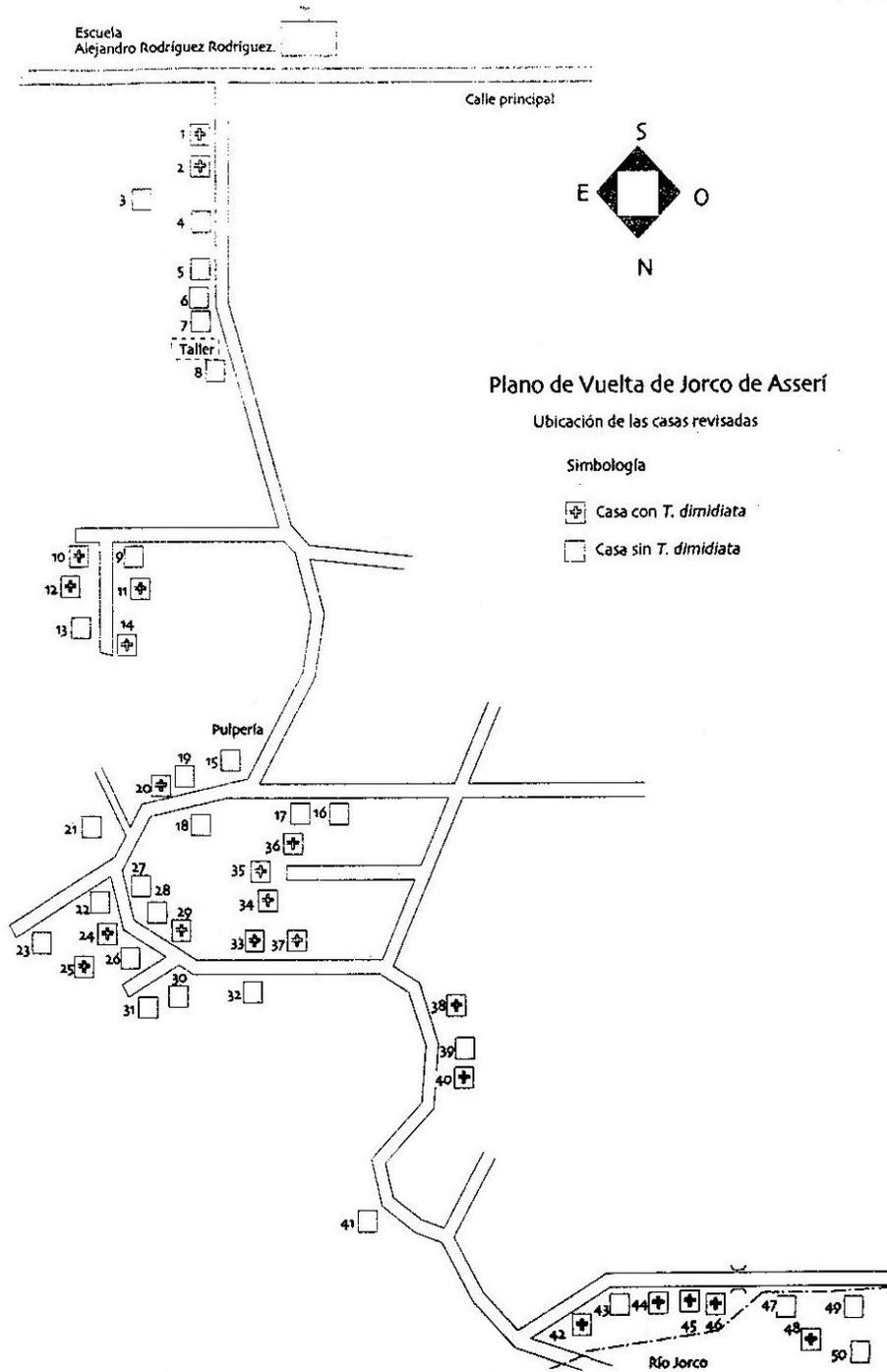


Figura 1. Distribución de casas positivas para *T. dimidiata* en la zona de Vuelta de Jorco en Aserrí, San José (Zeledón, 2001b).

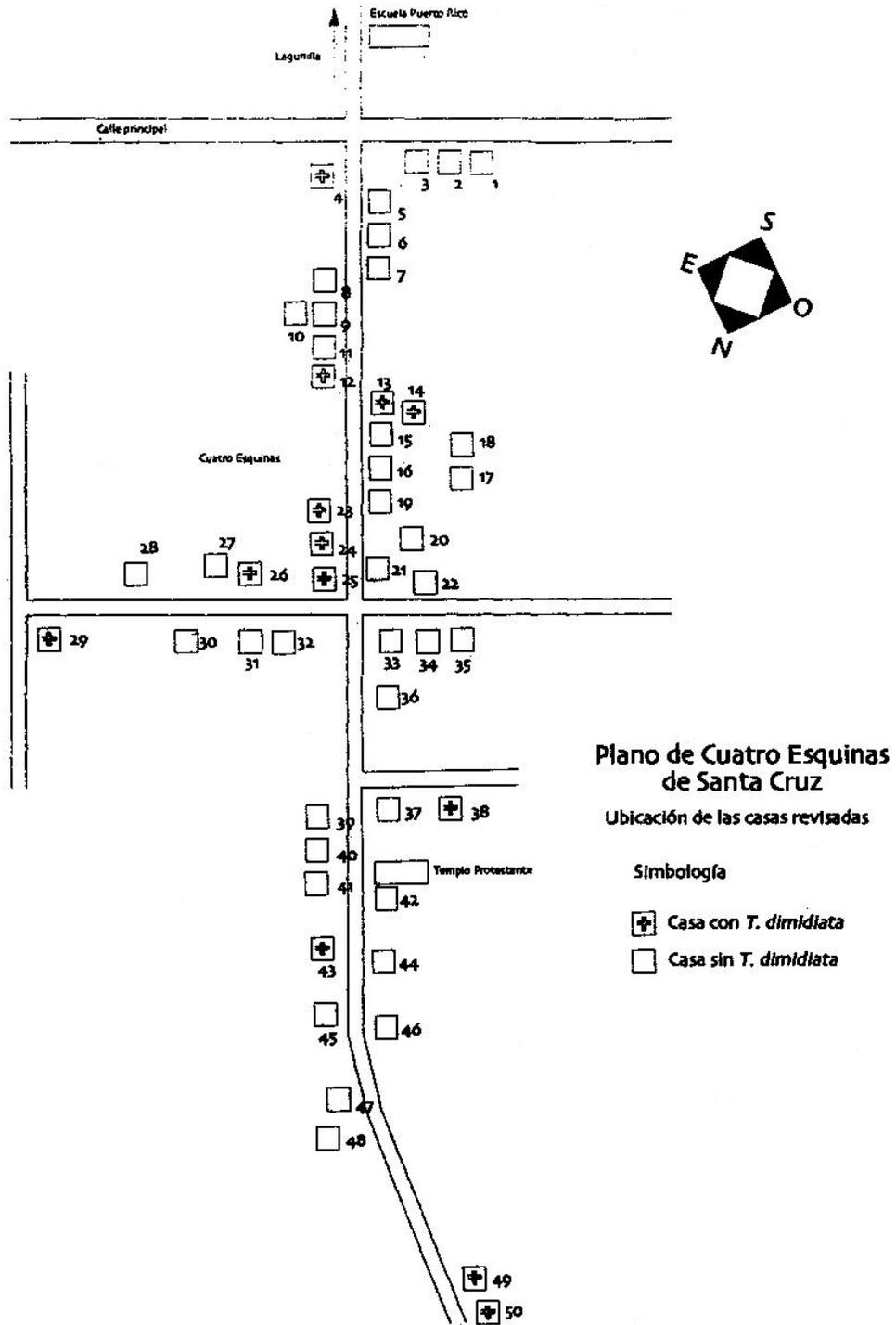


Figura 2 Distribución de casas positivas para *T. dimidiata* en la zona de Cuatro Esquinas de Santa Cruz, Guanacaste (Zeledón, 2001a).

2.2 Abordaje a nivel comunal: con el fin de permeabilizar a los pobladores de cada zona y motivarlos a participar; se organizó una primera reunión con los líderes espirituales de cada comunidad. A cada párroco se le informó la finalidad del estudio y se le entregó un comunicado escrito en el que brevemente se explicaba en qué consistía la investigación y los días en que se visitaría cada uno de los hogares. El comunicado fue leído al final de los oficios religiosos de dos fines de semana. Esto permitió que los pobladores estuvieran anuentes y receptivos a las siguientes visitas realizadas por un grupo de estudiantes y personal del Laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria, en las cuales de una manera más personalizada se les informó sobre la relevancia del estudio y se les transmitieron conocimientos generales sobre la enfermedad de Chagas y sus implicaciones en la salud humana y animal. También se procedió a numerar las casas, tomar los datos del jefe de familia y determinar el número de perros por hogar.

Al finalizar el estudio se realizó una visita más a cada una de las comunidades, en la cual se divulgaron los resultados del estudio, y se les comunicó el estado de salud de cada animal con respecto a la enfermedad de Chagas, finalmente se repartió en cada hogar un desplegable con información clara y precisa sobre la importancia de la enfermedad y cómo prevenirla, enfatizando la importancia de mantener las medidas de control ambiental para la eliminación de los vectores.

2.3 Selección de los hogares: en la zona de Vuelta de Jorco se eligieron 20 casas, mientras que en la localidad de Cuatro Esquinas fueron seleccionados 23. El único requisito de selección para los hogares fue poseer al menos un perro.

2.4 Selección de los animales: participaron en el estudio todos los perros de más de un mes de vida, pertenecientes a las casas previamente seleccionadas.

2.5 Examen de los animales: Con el fin de obtener un panorama más amplio sobre el estado de salud de los perros, a cada uno se le realizó una valoración física por medio de un examen objetivo general (EOG) antes de la toma de la muestra.

2.6 Obtención de la muestra de sangre: La sangre de perro se recolectó en tubos Vacutainer® sin anticoagulante por punción de la vena cefálica, utilizando jeringas de 5 ml con aguja de 22 x 1 ½". Los sueros se obtuvieron a partir de la sangre fresca, la cual se dejó coagular a temperatura ambiente por un periodo aproximado de 2 horas. Posteriormente los tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 4000 r.p.m (3220 g) en una centrífuga Iec modelo Centra CL2. Una vez finalizada la centrifugación, los sueros fueron transferidos a tubos Eppendorf® de 1.5 ml de capacidad, utilizando un mechero de alcohol de 120 ml para flamear la boca del tubo vacutainer y la pipeta Pasteur, con el fin de evitar al máximo la contaminación de los sueros. La cantidad mínima de suero que se recolectó fue de 0.5 ml por animal.

2.7 Transporte de las muestras: Los sueros fueron debidamente identificados y colocados en una hielera a -4 °C para su transporte hasta la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

2.8 Almacenamiento de las muestras: Las muestras fueron almacenadas en un congelador a -80 °C hasta que fueron utilizadas para las pruebas serológicas.

2.9 Prueba de Hemaglutinación Indirecta (HAI): Se utilizó un test comercial (Chagatest de Laboratorios Wiener®).

Primero se prepararon los reactivos contenidos en el kit: se reconstituyó el antígeno (Ag) y se dejó reposar por una hora. Se preparó el diluyente de sueros, colocando en un tubo de

ensayo 10 ul de solución proteica y 5 ml de buffer, y se hizo una solución de 2-Mercaptoetanol al 1% (10 ul de 2-Mercaptoetanol y 0.99 ml de solución salina).

Se marcaron las policubetas con las diluciones desde 1:2 hasta 1:128 y con la identificación de cada uno de los sueros; este procedimiento se repitió en la hoja de trabajo.

Con una micropipeta se tomaron 25 ul de 2- Mercaptoetanol al 1% y se colocaron en cada uno de los pocillos marcados con la dilución 1:2, luego se tomaron 25 ul de cada uno de los sueros y se depositaron en los pocillos de la dilución 1:2 que corresponde a cada uno. Por último se colocaron 25 ul de los controles positivos y negativos del kit y los controles positivos y negativos mantenidos en el Laboratorio de Zoonosis, en los pocillos marcados para este fin.

Finalizado el procedimiento se cubrieron las policubetas y se incubaron a 37 °C durante una hora.

Esta primera etapa se realiza para eliminar IgM presente en casos agudos de la enfermedad y también anticuerpos (Ac) interferentes que puedan producir falsos positivos o reacciones cruzadas.

Una vez finalizado el periodo de incubación, se colocaron 25 ul del diluyente de sueros utilizando una micropipeta Repeter de Eppendorf con punta de 25 ul (2.5 ml) en todos y cada uno de los pocillos (excepto en los marcados para la dilución 1:2). Se colocaron toallas de papel mojado con agua destilada debajo de cada policubeta para evitar interferencia por electrostática.

Se realizaron las diluciones seriadas de cada suero usando una micropipeta multicanal de Eppendorf, desde los pocillos 1:2 hasta llegar los pocillos marcados para la dilución 1:128, los 25 ul finales fueron descartados.

En los pocillos marcados con las diluciones 1:2 y 1:4 se colocaron 25 ul de glóbulos rojos no sensibilizados y en los pocillos marcados para la dilución 1:8 hasta 1:128 se colocaron 25 ul de Ag (o glóbulos rojos sensibilizados), utilizando la micropipeta Repeter de Eppendorf (Control de heterofilia).

Se limpió el fondo de las policubetas de lado a lado con una toalla de papel mojado, se cubrieron y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalizado este tiempo, se leyeron los resultados (Anexo V).

El punto de corte para esta prueba es $\geq 1:16$, de acuerdo a lo indicado por el kit.

2.10 Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):

Preparación del cultivo: En un medio de cultivo bifásico a base de sangre de conejo se colocaron 5ml de una fase líquida que contiene LIT + Suero fetal bovino (SFB) al 10% + antibióticos (Penicilina y Estreptomicina). Posteriormente se agregaron 200 ul de la cepa de *T. cruzi* "Jennifer", la cual fue aislada en el año 2003 de un caso agudo de la enfermedad y es mantenida en el Laboratorio de Zoonosis de la EMV-UNA en medio bifásico de SNK. Se incubó a 28 °C por un periodo que oscila entre los 5 y los 7 días.

Revisión del cultivo: se preparó una dilución 1:100, colocando 90 ul de solución Locke o PBS en dos tubos Eppendorf, al primer tubo se le adicionaron 10 ul de cultivo, se homogenizó; se extrajeron 10 ul que se depositaron en el segundo tubo Eppendorf. Con esta dilución se llenó una cámara de "Neubauer" y se procedió a contar la cantidad de parásitos. La cantidad idónea de parásitos se ajustó entre 1 000 000 y 1 500 000 parásitos / ml.

Preparación de las láminas: se tomó una lámina portaobjetos con 12 pocillos, en la cual se colocaron 20 ul de la dilución con parásitos, se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas o en estufa de 37 °C durante 15 minutos, y se sometieron a una tinción de Giemsa

para determinar que la distribución de los parásitos fuera la correcta. Una vez realizada la prueba anterior se procedió a llenar todas las láminas de la misma manera. Transcurridas 24 horas, las láminas fueron fijadas con acetona y congeladas a -20°C .

Realización de la prueba: se organizaron los mapas de las muestras a procesar. Se descongelaron las láminas. Se inactivaron los sueros durante 30 minutos a 56°C y se hicieron las diluciones apropiadas (de 1:8 hasta 1:256 para cada suero), se agregaron 20 μl de cada dilución a los pocillos correspondientes. Se incubaron a 37°C por 30 minutos en cámara húmeda.

Se lavaron las láminas 2 veces durante 10 minutos en PBS pH 7.2 y se agregaron 20 μl del conjugado (IgG antiperro, molécula entera marcada con fluoresceína), previamente diluido (1:40) en PBS 1X estéril, conteniendo azul de Evans, se incubaron a 37°C por 30 minutos en cámara húmeda.

Las láminas se lavaron nuevamente 2 veces durante 10 minutos en PBS pH 7.2, se secaron al aire y cada una se montó con glicerol al 90% en PBS pH 8. Se leyeron al microscopio de inmunofluorescencia con objetivo de 40X.

El punto de corte para esta prueba es $\geq 1:32$, previamente establecido por el Laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria-UNA.

Interpretación: las reacciones consideradas positivas fueron aquellas en las que se observa fluorescencia localizada principalmente en las membranas y el flagelo del tripanosoma (Anexo VI). En las reacciones negativas los parásitos se ven rojizos o tienen discreta coloración intracelular y no periférica (Álvarez et al., 1968).

En ambas pruebas serológicas se incluyeron controles positivos y negativos previamente seleccionados en el Laboratorio de Zoonosis.

2.11 Seguimiento de las estrategias de control ecológico para *T. dimidiata*: Durante las giras programadas para la recolección de chinches realizada en Vuelta de Jorco, se seleccionaron los mismos 20 hogares que habían sido elegidos como parte del estudio de Zeledón y Rojas. (2006) en el año 2004 (Figura 3), donde fueron sometidos a una serie de modificaciones ambientales con el afán de reducir al mínimo la población de insectos. Este seguimiento se realizó para determinar si las personas aún mantenían dichas modificaciones o si después de la intervención habían retomado los hábitos de disponer la leña, basura y otros desechos en lugares no apropiados, condiciones que favorecen la colonización y multiplicación de los chinches (Zeledón & Rojas, 2006).

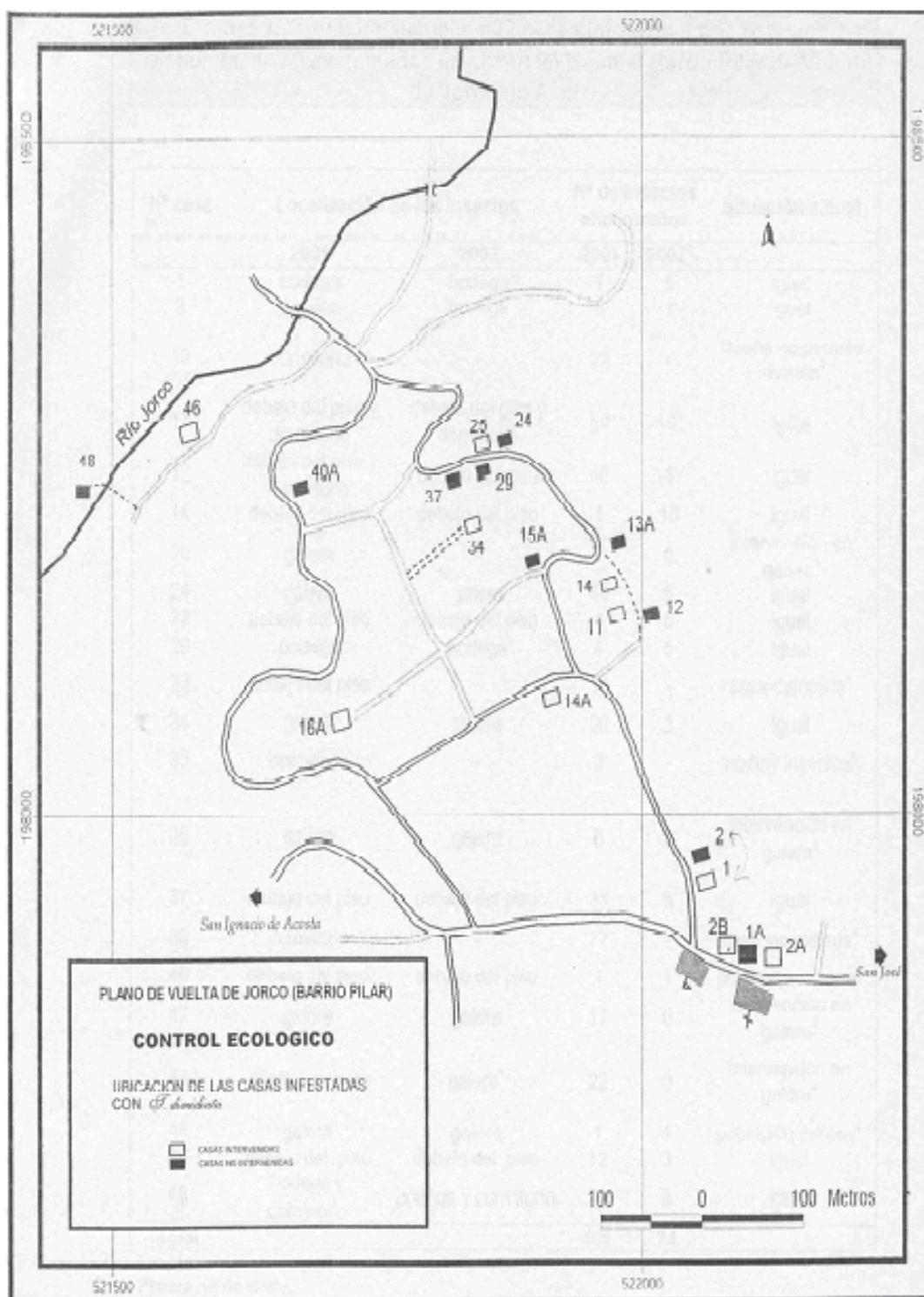


Figura 3. Distribución de las casas de barrio “El Pilar” sometidas a intervenciones ambientales como parte del Control Ecológico contra *Triatoma dimidiata*. (Zeledón & Rojas, 2006)

2.12 Recolecta de chinches: la recolección de especímenes de *T. dimidiata* se realizó en compañía de un trabajador calificado para efectuar dicha tarea. Se revisó minuciosamente dentro y alrededor de los hogares. En la localidad de Santa Cruz se eligieron 17 hogares de los 23 previamente seleccionados, mientras que en Vuelta de Jorco se trabajó bajo la selección arriba mencionada. La recolección se realizó para confirmar la efectividad de las estrategias de control ecológico para *T. dimidiata*.

2.13 Electrocardiograma (ECG): Los animales de "Barrio Pilar" con resultado positivo para la IFI y/o HAI fueron sometidos a un electrocardiograma, con el fin de determinar si existía algún grado de compromiso cardiaco. Se utilizó una velocidad de 50mm / sec y una sensibilidad de 1cm = 1mV y la interpretación se realizó en la derivación II.

2.14 Coeficiente Kappa o Prueba de Concordancia: Cuando el estudio de la variabilidad incluye clasificaciones categóricas, deben distinguirse dos componentes en la posible falta de precisión. El primero es el sesgo entre observadores, que se refleja entre las diferencias en la distribución de la variable para cada uno de los observadores. El segundo es el desacuerdo entre observadores, que es indicado por la forma en la que los observadores clasifican los individuos en la misma categoría en la escala de medición, para este segundo caso el Coeficiente Kappa es uno de los enfoques más comunes (Argimon & Jiménez, 2000).

Este es un índice que compara la concordancia versus lo que cabría esperar por azar y puede ser concebido como la oportunidad de corregir el acuerdo proporcional. Sus posibles valores van de 1 (perfecto acuerdo) a través de 0 (ningún acuerdo por encima del esperado por azar) a -1 (completo desacuerdo) (Argimon & Jiménez, 2000).

Para realizar este análisis se utilizó el paquete estadístico Win Episcope 2.0 (Thrusfield et al., 2001), el cual se trabaja en ambiente Microsoft Windows.

2.15 Evaluación de IFI versus HAI (Estándar de Oro): esta evaluación se realiza para determinar la validez (Se: Sensibilidad y Sp: Especificidad) de la IFI. Para determinarla se necesita una segunda prueba conocida como "Estándar de oro". En este caso particular, se consideró HAI como la Prueba de Oro ya que se estableció como la mejor referencia, dada la naturaleza de su fabricación. Para realizar este análisis se utilizó el paquete estadístico Win Episcope 2.0 (Thrusfield et al., 2001).

2.16 Significancia estadística: se realiza una prueba de hipótesis para diferencia de porcentajes, con el fin de valorar si existen o no diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de los dos grupos de perros evaluados.

3. RESULTADOS

3.1 Resultados serológicos

En el presente estudio se analizaron 91 sueros de perro, los cuales fueron sometidos a dos pruebas: la Hemaglutinación indirecta (HAI) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI), para detectar la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi*.

De estos 91 sueros 10 (10.99%) mostraron resultados positivos a la prueba HAI (7 hembras y 3 machos) y 13 (14.29%) fueron positivos para la IFI (8 hembras y 5 machos) (Cuadros 1 y 2).

Cuadro 1. Prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en perros de dos zonas endémicas de Costa Rica

| <i>Tipo de localidad</i> | <i>HAI</i> | | <i>IFI</i> | |
|--------------------------|----------------------|----------|----------------------|----------|
| | <i>Positividad *</i> | <i>%</i> | <i>Positividad *</i> | <i>%</i> |
| Vuelta de Jorco | 6/31 | 19.35 | 7/31 | 22.58 |
| Cuatro Esquinas | 4/60 | 6.67 | 6/60 | 10.0 |
| Total | 10/91 | (10.99%) | 13/91 | (14.29%) |

* Número de animales positivos / número de animales estudiados

Cuadro 2. Título y sexo de los 13 animales seropositivos a HAI y/o IFI.

| Identificación del animal | Sexo | Título HAI | Título IFI |
|---------------------------|-------------------------|------------|------------|
| 06 | Hembra | 1:128 | 1:128 |
| 08 | Macho | 1:128 | 1:256 |
| 09 | Macho | 1:128 | 1:256 |
| 13B | Macho | Negativo | 1:256 |
| 13D | Hembra | 1:64 | 1:256 |
| 17B | Macho | 1:64 | 1:256 |
| 33 | Hembra | 1:64 | 1:64 |
| 30B | Hembra | 1:64 | 1:256 |
| 46 | Hembra | 1:128 | 1:256 |
| 47 | Hembra | 1:16 | 1:128 |
| 49 | Hembra | 1:16 | 1:64 |
| B5 | Hembra | Negativo | 1:256 |
| 26E | Macho | Dudoso | 1:64 |
| Total | 5 Machos / 8 hembras | 10 | 13 |

Dos de los sueros analizados mostraron resultados dudosos o inconcluyentes en la prueba de HAI, la prueba se repitió utilizando un kit totalmente nuevo y el resultado obtenido fue el mismo. Estos sueros se reportan como dudosos o con resultado inconcluyente para esta prueba. Sin embargo, uno de los sueros fue positivo para IFI, mientras que el otro fue negativo.

La zona de mayor seroprevalencia fue Vuelta de Jorco, ya que de un total de 31 animales 6 (19.35%) fueron positivos al HAI y 7 (22.58%) fueron positivos al IFI; mientras que en la zona de Cuatro Esquinas, donde se muestrearon 60 animales 4 (6.67%) dieron resultados positivos al HAI y 6 (10.00%) fueron positivos a la IFI.

El grueso de los animales seropositivos se ubica entre 1 y 6 años de edad (Figuras 4 y 5)

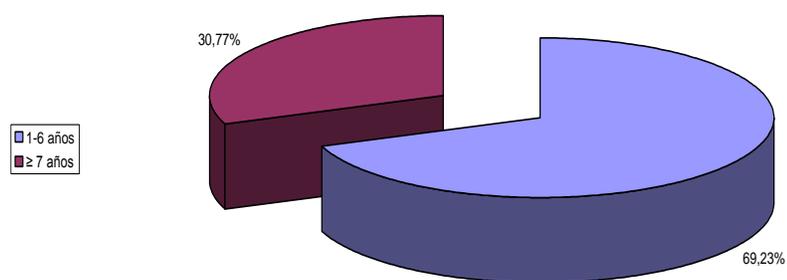


Figura 4. Distribución por edad de animales positivos a la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi*.

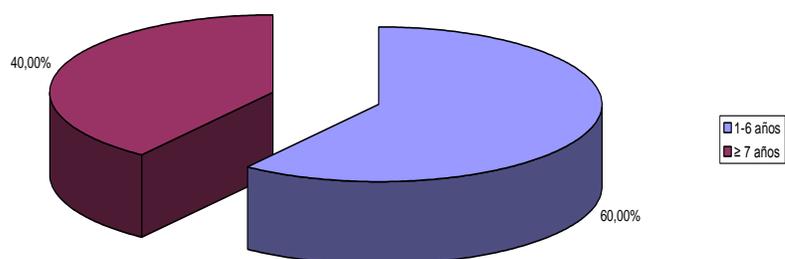


Figura 5. Distribución por edad de animales positivos a la prueba de Hemaglutinación Indirecta para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi*.

3.2 Resultados de ECG

Se realizó un electrocardiograma a 5 de los 6 animales seropositivos de "Barrio Pilar", ya que uno de los canes falleció por envenenamiento días antes de efectuarse esta prueba.

Los ECG de 4 de los animales se consideraron normales. El can identificado con el número 46 presentó las siguientes anomalías: bloqueos sinusuales con complejos de escape de origen atrial y un complejo atrioventricular prematuro (Cuadro 3 y Anexo VII).

Cuadro 3. Detalle de los electrocardiogramas de 5 perros con serología positiva para la Enfermedad de Chagas.

| Identificación del animal | 06 | 08 | 09 | 46 | 47 |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--|---------------------|
| Frecuencia cardiaca | 120 l/min | 120 l/min | 140 l/min | 120 l/min | 100 l/min |
| Ritmo | Arritmia sinusual | Arritmia sinusual | Ritmo Sinusual | Bloqueos sinusuales, complejos de escape atriales, complejo AV prematuro | Arritmia sinusual |
| Onda P | 0.03 sec 0.1 mV | 0.04 sec 0.2 mV | 0.03 sec 0.1 mV | 0.03 sec 0.1 mV | 0.03 sec 0.05 mV |
| Intervalo P-R | 0.08 sec | 0.08 sec | 0.06 sec | 0.08 sec | 0.06 sec |
| Complejo QRS | 0.05 sec 0.9 mV | 0.04 sec 0.9 mV | 0.05 sec 0.2 mV | 0.03 sec 0.8 mV | 0.03 sec 0.4 mV |
| Intervalo Q-T | 0.17 sec | 0.2 sec | 0.18 sec | 0.16 sec | 0.18 sec |
| Segmento S-T | Normal | Normal | Normal | Normal | Normal |
| Onda T | Normal | Normal | Normal | Normal | Normal |

3.3 Resultado del Coeficiente Kappa o prueba de concordancia

Luego del análisis correspondiente, se obtuvo un índice Kappa de 0.896, utilizando un nivel de confianza del 95% (Cuadro 4).

El grado de acuerdo utilizando el Coeficiente Kappa está catalogado como muy bueno (0.8-1), lo que indica que la concordancia entre las pruebas utilizadas es satisfactoria. Para calcular éste índice se utilizaron sólo 89 resultados, ya que los dos resultados dudosos o inconcluyentes quedan excluidos.

Cuadro 4. Distribución de los resultados a las pruebas serológicas y Coeficiente Kappa.

| IFI | HAI | | Total |
|--------------|-----------|-----------|-----------|
| | Positivo | Negativo | |
| Positivo | 10 | 2 | 12 |
| Negativo | 0 | 77 | 77 |
| Dudoso* | 1 | 1 | 2 |
| Total | 11 | 80 | 91 |

*Los animales con resultado dudoso quedan excluidos.

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| Nivel de confianza | 95% |
| Proporción de conformidad observado | 0.978 |
| Proporción de conformidad esperado | 0.783 |
| Conformidad esperada menos azar | 0.194 |
| Máxima conformidad no debida al azar | 0.217 |
| Kappa | 0.896 |

3.4 Resultado de la evaluación de IFI versus HAI

Para realizar esta evaluación se utilizan solo 89 resultados, ya que los dos resultados dudosos o inconcluyentes quedan excluidos.

Utilizando un nivel de confianza del 95% se obtuvo una Se del 100% con un VP- (Valor Predictivo Negativo) de un 100% (Cuadro 5).

Cuadro 5. Distribución de los resultados a las pruebas serológicas y evaluación de IFI versus HAI.

| IFI | HAI (Prueba de Oro) | | Total |
|----------|------------------------|----|-------|
| | Si | No | |
| Positivo | 10 | 2 | 12 |
| Negativo | 0 | 77 | 77 |
| Total | 10 | 79 | 89* |

| Nivel de confianza: 95% | % | Límite Inferior | Límite Superior |
|---------------------------|---------|-----------------|-----------------|
| Sensibilidad | 100,000 | 100,000 | 100,000 |
| Especificidad | 97,468 | 94,004 | 100,00 |
| Valor predictivo positivo | 83,333 | 62,247 | 100,000 |
| Valor predictivo negativo | 100,000 | 100,000 | 100,000 |

* Se excluyen los animales cuyo resultado a las pruebas serológicas fue dudoso o inconcluyente.

3.5 Resultado de la prueba de hipótesis para la diferencia de porcentajes

Utilizando un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$); se determinó $p = 0.08$ y por lo tanto la diferencia entre los resultados de los dos grupos estudiados no es significativa.

3.6 Resultado de la recolecta de chinches y control ecológico

Con respecto a la recolección de chinches, se inspeccionó un total de 37 casas, 20 de Vuelta de Jorco y 17 de Cuatro Esquinas. De estos hogares 2 (5.4%) mostraron una infestación por *T. dimidiata* y la totalidad de insectos fue recolectada en el peridomicilio.

Es importante recalcar que los hogares infestados con *T. dimidiata* corresponden a la zona de Vuelta de Jorco. En Cuatro Esquinas se buscaron condiciones que favorecieran la colonización y multiplicación de los chinches; sin embargo, los hallazgos fueron nulos, debido a las buenas prácticas de los vecinos y a la constante fumigación.

El seguimiento a las estrategias de control ecológico para *T. dimidiata* se realizó en 20 hogares, de acuerdo al plan piloto establecido por Zeledón y Rojas (2006), de los cuales 10 fueron casas control y 10 fueron intervenidas. En las casas control también se realizaron modificaciones ambientales un año después. En este estudio 2 hogares (10%) mostraron infestación peridomicilar y 18 (90%) se encontraron libres de chinches (Cuadro 6).

Cuadro 6. Condición actual de las 20 casas sometidas a control ecológico, 4 y 3 años después de haber realizado las modificaciones ambientales

| Casa | Hallazgos | Presencia de insectos | Localización de los insectos | Cantidad de insectos |
|------|---|-----------------------|---|----------------------|
| 1 | Las modificaciones se mantuvieron | No | - | - |
| 1A | IDEM | No | - | - |
| 12 | IDEM | No | - | - |
| 13A | IDEM | No | - | - |
| 15A | Nueva construcción | No | - | - |
| 24 | Las modificaciones se mantuvieron | No | - | - |
| 29 | IDEM | No | - | - |
| 37 | Las modificaciones peridomiciliares no se mantuvieron | Si | Bodega utilizada para guardar madera y como gallinero | 231 |
| 40A | Las modificaciones se mantuvieron | No | - | - |
| 48 | Nueva construcción | No | - | - |
| 2 | Las modificaciones se mantuvieron | No | - | - |
| 2A | Las modificaciones peridomiciliares no se mantuvieron | Si | Bodega | 21 |
| 2B | Las modificaciones se mantuvieron | No | - | - |
| 11 | IDEM | No | - | - |
| 14 | IDEM | No | - | - |
| 14A | IDEM | No | - | - |
| 16A | IDEM | No | - | - |
| 25 | IDEM | No | - | - |
| 34 | IDEM | No | - | - |
| 46 | IDEM | No | - | - |

4. DISCUSION

El mal de Chagas es una enfermedad zoonótica en la que participan reservorios silvestres, peridomiciliares y domiciliarios (Schmuñis, 1991). Estudios realizados en otros países, demuestran el importante papel que juega el perro como reservorio intradomiciliar (Rojas et al., 1973; Wisnivesky-Colli et al., 1985).

Este estudio analizó la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en una muestra de sueros de perros mascota, provenientes de dos zonas rurales de nuestro país.

Las pruebas serológicas juegan un papel muy importante en la detección de la enfermedad de Chagas, ya que durante la fase crónica de infección la parasitemia tiende a ser baja e inconsistente, por lo que el diagnóstico debe realizarse por medio de estos métodos indirectos (Luquetti, 1990).

Se determinó que el empleo de dos pruebas serológicas con diferente principio, tales como HAI e IFI brindan resultados satisfactorios; como lo sugiere Luquetti (1990), ya que HAI es una técnica sencilla pero costosa, que se caracteriza por tener una alta especificidad (97.6%), pero posee también una sensibilidad menor que otras técnicas empleadas para este mismo fin (92.5%), por lo tanto no es recomendable aplicarla como única herramienta diagnóstica. La IFI es una técnica rápida que permite procesar un gran número de muestras, sin embargo su especificidad no es tan alta, lo que puede producir reacciones cruzadas en títulos bajos con algunas enfermedades como leishmaniasis visceral. Sin embargo, la combinación de estas dos técnicas genera resultados satisfactorios ya que se logra compensar la relativa baja sensibilidad de HAI con la alta sensibilidad de IFI, y la baja especificidad de IFI con la alta especificidad de HAI. Además, ambos métodos tienen ventajas

indiscutibles: son reproducibles, rápidos, utilizan pocos reactivos y por lo tanto hay menor posibilidad de errores.

La aparición de dos resultados dudosos a la HAI (siendo uno positivo y otro negativo para IFI) sugiere la aplicación de una tercera prueba diagnóstica para determinar el estado serológico real de esos animales. Sin embargo es posible suponer, para el caso del resultado dudoso en HAI pero positivo a IFI, que los títulos de anticuerpos se encuentren bajos por lo que escapan a la primera prueba, o en su defecto puede suceder que exista una reacción cruzada, ante la cual, un estímulo antigénico similar puede producir una respuesta interpretada como positiva en IFI, mientras que esta posibilidad disminuye considerablemente en HAI por la presencia de glóbulos rojos no sensibilizados y 2- mercaptoetanol.

Dos sueros fueron positivos a IFI, pero negativos a HAI, esto puede atribuirse a la alta sensibilidad de la primera prueba (Luquetti, 1990).

Bajo el concepto que únicamente los sueros reactivos en ambas pruebas serían considerados positivos a la enfermedad, se obtuvo un total de 10 animales, para una seroprevalencia general de 10.99%.

Estudios previos se han realizado en otras zonas y han demostrado diferentes porcentajes de seropositividad que oscilan entre 1.6% y 27.7%, así como el hallazgo de vectores y el aislamiento del parásito (Zeledón et al., 1975; Calderón et al., 2002; Montenegro et al., 2002; Reyes et al., 2002; Zeledón et al., 2005).

El hallazgo de perros mascota infectados es de importancia epidemiológica por su cercanía con el hombre y por la posibilidad de que los triatóminos se alimenten de estos hospedadores, reservorios domésticos, y propaguen de esta manera la enfermedad, tomando

en consideración que la transmisión del parásito puede darse en cualquier dirección entre hospedero y vector (Gürtler et al., 1993 y 1998).

Si bien es cierto que la mayoría de los animales positivos se encuentran entre 1 y 6 años, no existen datos en la literatura que indiquen una preferencia alimentaria de los vectores basada en sexo o edad; sin embargo, es razonable esperar que a mayor edad; mayor probabilidad de entrar en contacto con vectores infectados. Es importante recalcar que las muestras escogidas para este estudio fueron elegidas aleatoriamente.

Desde el punto de vista veterinario es importante recordar que la enfermedad de Chagas causa deficiencia cardíaca, con disturbios en la conducción eléctrica y arritmias. Se debe aclarar que la arritmia sinusual presentada por los pacientes identificados con los números 06, 08, 46, 47 se considera como un hallazgo normal en perros sanos ya que esta irregularidad en el ritmo no es patológica (Tilley & Burtnik, 1999). Las alteraciones presentadas en el ECG del animal 46 sugieren un daño estructural en la pared del miocardio; sin embargo, al presentarse de forma aislada no generan cambios hemodinámicos (Tilley & Burtnik, 1999).

Las estrategias de control ecológico mostraron ser altamente efectivas, ya que en las casas donde las medidas fueron mantenidas por sus moradores no fue posible encontrar insectos. Mientras que en las dos casas donde las modificaciones ambientales fueron abandonadas se encontró un total de 252 insectos.

Como producto de las reuniones previas comunicando a los pobladores los fines del estudio y la importancia del mismo, se debe destacar la anuencia de los pobladores de las comunidades a participar en el estudio así como su disposición para aprender sobre la enfermedad y su agradecimiento por la labor realizada por los estudiantes y el personal del Laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria.

A través de las visitas periódicas y la entrega del despegable informativo se logró educar a los pobladores, esta labor es fundamental ya que una comunidad informada es una herramienta útil en la lucha contra las enfermedades.

Finalmente, esta investigación recalca la importancia del trabajo en equipo entre médicos veterinarios, microbiólogos, personal capacitado y las comunidades para lograr un abordaje integrado de esta enfermedad zoonótica de interés en el ámbito de salud pública.

5. CONCLUSIONES

- La seroprevalencia general de *T. cruzi* en perros mascotas de dos zonas endémicas fue de 10.99%, utilizando las pruebas de HAI e IFI.
- La prevalencia indicada por la prueba HAI fue de 10.99%, mientras que la indicada por IFI fue de 14.29%.
- La seroprevalencia para "Barrio Pilar" fue de 19.35%, mientras que para "Cuatro Esquinas" fue de un 6.67%.
- Al comparar los resultados obtenidos en ambas poblaciones se determinó que la mayor seropositividad se encontró en la zona con altos índices de infestación, que corresponde al Barrio Pilar.
- De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que los altos índices de infestación con *T. dimidiata* están asociados a una mayor seropositividad en perros.
- Con respecto a las medidas de control ecológico, se determinó que en 2 casas se abandonaron parcial o totalmente las modificaciones ambientales realizadas en el peridomicilio. En 18 casas se mantuvieron dichas modificaciones y no se logró encontrar especímenes de *T. dimidiata*, lo que confirma su sostenibilidad y efectividad.
- En un animal se logró encontrar disturbios en la conducción eléctrica cardíaca.
- El análisis estadístico reveló que la concordancia entre las pruebas y su validez permiten concluir que los resultados obtenidos son un reflejo fehaciente de lo que sucede actualmente en las poblaciones caninas de las zonas estudiadas.
- No existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de perros sometidos al estudio.

6. RECOMENDACIONES

- Con respecto a los dos resultados serológicos dudosos se recomienda realizar una tercera prueba de alta sensibilidad y especificidad (ELISA, por ejemplo) para determinar el verdadero estado serológico de estos animales.
- Se recomienda también divulgar y extender las medidas de control ecológico a otras zonas endémicas para la enfermedad en nuestro país, ofreciendo charlas comunales para fomentar la educación de los pobladores.
- En "Barrio Pilar" instaurar una vigilancia epidemiológica orientada a verificar el manejo ambiental.
- Ampliar el estudio entomológico y serológico a otras zonas endémicas del país.
- Considerar la enfermedad de Chagas dentro de los diagnósticos diferenciales en casos de animales de zonas endémicas que presenten sintomatología compatible con esta infección.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

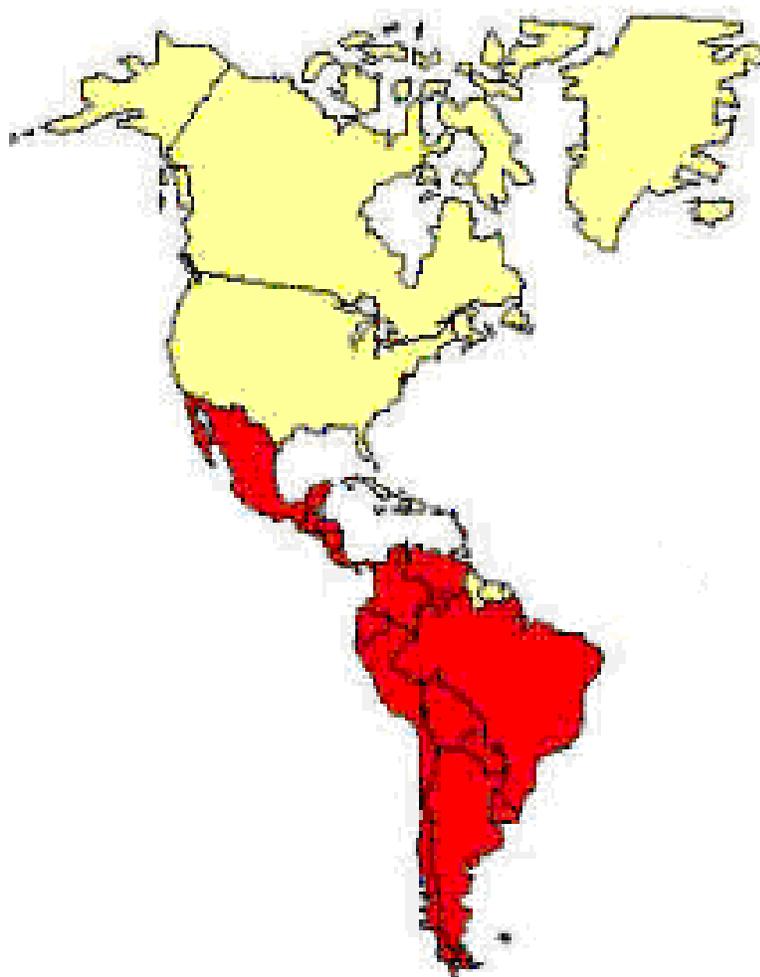
- Álvarez, M., J. Cerisola & R. Rohwedder. 1968. Test de inmunofluorescencia para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Chile. Parasit. 23: 4-9.
- Argimon, J & J. Jiménez. 2000. Interpretación de resultados. p: 219-273. In J. Argimon & J. Jiménez. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. Harcourt S.A. España.
- Azogue, E., C. LaFuente & C.H. Darras. 1985. Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 79:176-180.
- Barr, S.C., K.A. Gossett & T.M. Klei. 1991. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observations of trypanosomiasis in dogs infected with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. Am. J. Vet. Res. 52: 954-960.
- Bowman, D. 2003. Arthropods. p: 483-85. In D., Bowman. Georgi's parasitology for veterinarians. Saunders. USA.
- Calderón, O., M. Chinchilla, F. García & M. Vargas. 2001. Preferencias alimentarias de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) procedente de la meseta central de Costa Rica a finales del siglo XX. Parasitol. día. 25: 18-26.
- Calderón, O., A. Troyo, A. Castro, O. Guerrero & M. Chinchilla. 2002. Infestación por vectores de la Enfermedad de Chagas en cuatro zonas endémicas de la meseta central de Costa Rica. Parasitol. Latinoam. 57: 88-95.
- Dias, J.C. P. 2000. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. p 48-60. In Brener, Z. Andrade, Z. & Barral- Netto. Epidemiología. Brasil.
- Gürtler, R., M.C. Cécere, D.N. Rubel, R.M. Petersen, N.J. Schweigmann, M.A. Luricella, M.A. Bujas, E.L. Segura & C. Wisnivesky-Colli. 1991. Chagas' disease in north-west Argentina: infected dogs as a risk factor for the domestic transmission of *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 85: 741-745.
- Gürtler, R., M.C. Cécere, R. M. Petersen, D.N. Rubel & N.J. Schweigmann. 1993. Chagas' disease in north-west Argentina: association between *Trypanosoma cruzi* parasitemia in dogs and cats and infection rates in domestic *Triatoma infestans*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87: 12-15.
- Gürtler, R., J.E. Cohen, M.C. Cécere, M.A. Luricella, R. Chuit & E.L. Segura. 1998. Influence of humans and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in northwest Argentina. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58: 748-758.

- Hofflin, J.M., R.H. Sadler, F.G. Araujo, W.E. Page & J.S. Remington. 1987. Laboratory-acquired Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81:437-440.
- Luquetti, A. 1990. Use of *Trypanosoma cruzi* defined proteins for diagnosis- multicentre trial serological and technical aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 85: 497-505.
- Montenegro, V., M. Jimenez, J.C. Pinto-Dias & R. Zeledón. 2002. Chagas' disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 97: 491-494.
- Ponce, C. & E. Ponce. 1999. La enfermedad de Chagas transfusional en Honduras y otros países de América Central. *Medicina.* 59:135-137.
- Reyes, L., E. Silesky, C. Cerdas, M. Chinchilla & O. Guerrero. 2002. Presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en perros de Costa Rica. *Parasitol. Latinoam.* 57: 66-68.
- Rojas, A., J. Sotelo, F. Villarroel & M. Contreras. 1973. La importancia del perro y el gato en la epidemiología de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chile. Parasit.* 38: 42-43.
- Schmuñis, G. 1991. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood transmission in endemic and non endemic countries. *Trasfusion.* 31: 548-556.
- Sherlock, I. 2000. Vetores In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. p. 21. 2nd Edition. Editores Brener, Z. Andrade, Z. & Barral Neto. Brasil.
- Thrusfield, M., C. Ortega, I. de Blas, J.P. Noordhuizen & K. Franquena. 2001. Win Episcopo 2.0: Improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.* 148:567-572.
- Tilley, L.P & N. L Burtnick. 2000. Disturbances in heart rhythm. p: 24. In Tilley, L.P & N. L Burtnick. ECG electrocardiography for the small animal practitioner. Tenton New Media. USA.
- W.H.O. World Health Organization, 1991. Control of Chagas' disease. Technical Report Series N°: 811. Geneve, Switzerland. 95 pp.
- Wisnivesky-Colli, C., R. Gurtler, N. Solarz, M. Lauricella & E. Segura E. 1985. Epidemiological role of humans, dogs and cats in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a central area of Argentina. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo.* 27: 346-352.
- Zeledón, R. 1976. Effects of triatomine behavior on trypanosome transmission. *Pan Am. Hlth. Org.* 318: 326-329.
- Zeledón, R. 1996. Hemoflagellates in American Trypanosomiasis (Chagas Disease). p. 981-994. In Barron's Medical Microbiology. University of Texas Medical Branch, USA .

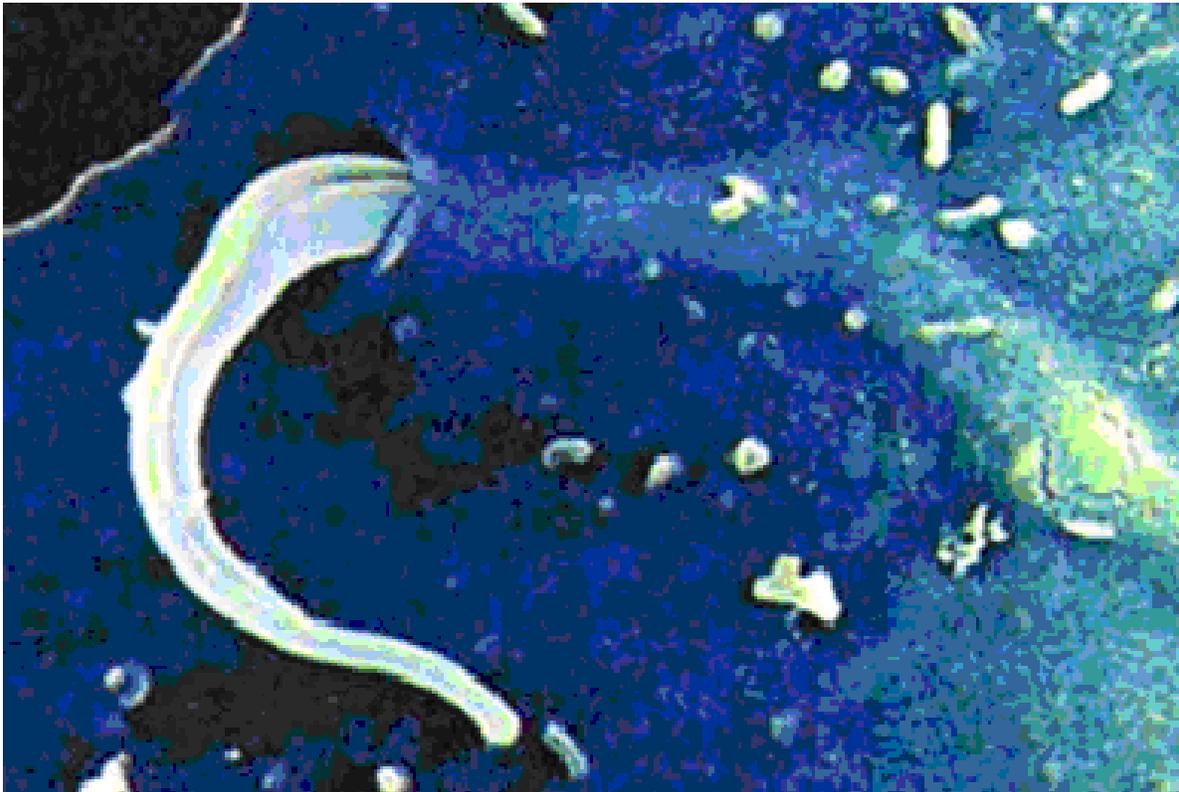
- Zeledón, R. 2001a. Encuesta sobre la prevalencia de *T. dimidiata* en el poblado de Cuatro Esquinas, zona rural de Santa Cruz, provincial de Guanacaste. Consultoría realizada para el Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA).
- Zeledón, R. 2001b. Encuesta sobre la prevalencia de *T. dimidiata* en el poblado de Cuatro Barrio Pilar, zona rural en Vuelta de Jorco de Aserrí, provincial de San José. Consultoría realizada para el Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA).
- Zeledón, R. & L. Vargas. 1984. The role of dirt floors and of firewood in rural dwellings in the epidemiology of Chagas' disease in Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 232-235.
- Zeledón, R. & J. Rojas. 2006. Environmental management for the control of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), (Hemiptera: Reduviidae) in Costa Rica: a pilot project. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101:379-386.
- Zeledón, R., V. Montenegro & O. Zeledón. 2001. Evidence of Colonization of Man-made Ecotopes by *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) in Costa Rica. Short Communication. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96: 659-660.
- Zeledón, R., V. Guardia, A. Zúñiga & J.C. Swartzwelder. 1970a. Biology and Ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) I. Life cycle, amount of blood ingested. Resistance to starvation, and size of adults. *J. Med. Ent.* 7: 313-319.
- Zeledón, R., V. Guardia, A. Zúñiga & J.C. Swartzwelder. 1970b. Biology and Ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) II. Life span of adults and fecundity and fertility of females. *J. Med. Ent.* 7: 462-469.
- Zeledón, R., G. Solano, A. Zúñiga & J.C. Swartzwelder. 1973. Biology and Ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) III. Habitat and blood sources. *J. Med. Ent.* 10: 363-370.
- Zeledón, R., G. Solano, L. Burstin & J.C. Swartzwelder. 1975. Epidemiological pattern of Chagas' disease in an endemic area of Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 214-225.
- Zeledón, R., N. Calvo, V. Montenegro, E. Seixas & C. Arévalo. 2005. A survey on *Triatoma dimidiata* in an urban area of the province of Heredia, Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100: 507-512.

8. ANEXOS

I. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas en el Continente Americano, en color rojo se encuentran los países endémicos.



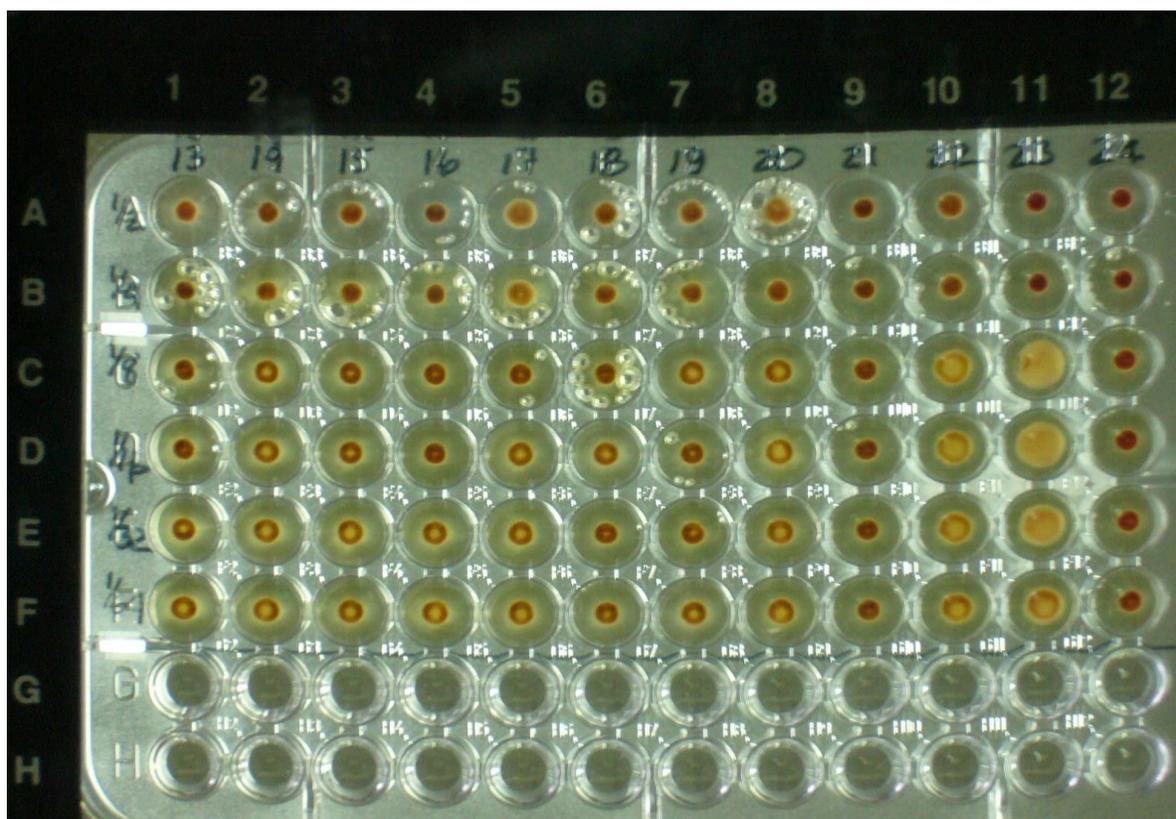
II. Magnificación en microscopia electrónica de un tripomastigoto penetrando una célula humana.



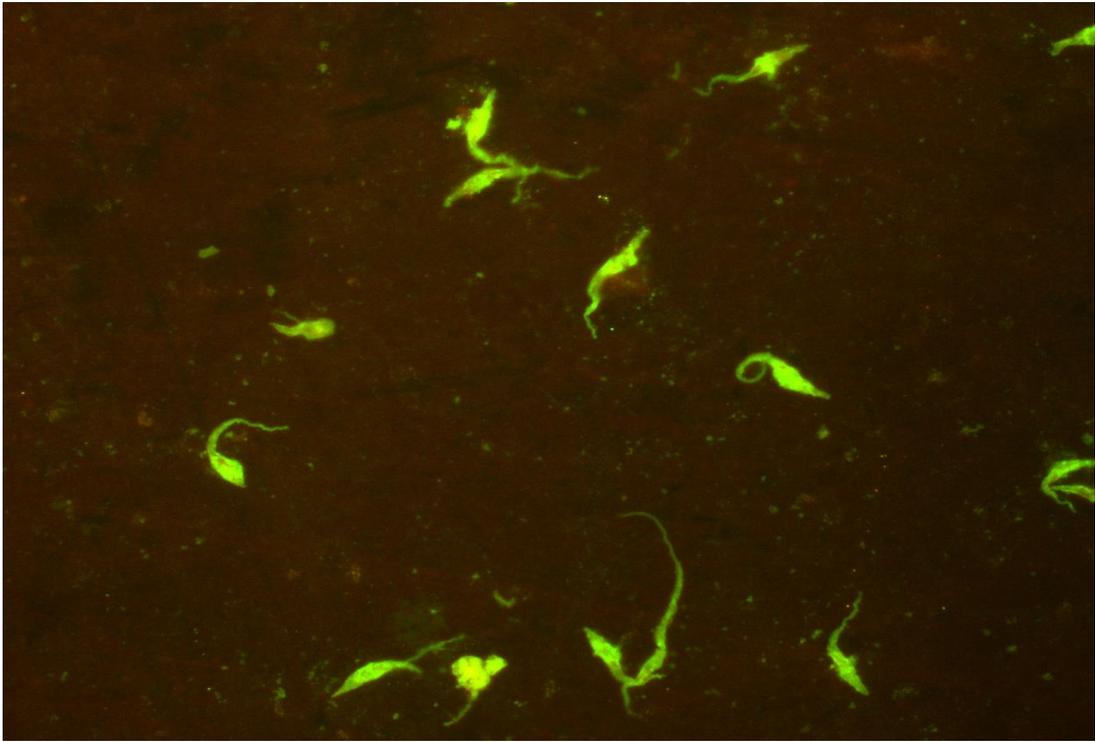
IV. Condiciones que favorecen la colonización y multiplicación de triatóminos: galerones con pilas de leña dispuestas sobre el suelo.



V. Reacciones positivas y negativas a la prueba Hemaglutinación Indirecta. En los pocillos 10 y 11 C, D, E y F se observa claramente el halo que indica una reacción positiva hasta la dilución 1:64, mientras que en los demás pocillos las reacciones son negativas.



VI. Reacción positiva de un suero canino para la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta.



VII. Electrocardiograma: rangos y valores normales

| | |
|--|--|
| Frecuencia cardiaca | 70 – 160 l/min |
| Ritmo | Ritmo sinusal Arritmia sinusal |
| Onda P (valores máximos aceptados) | 0.04 sec 0.4 mV |
| Intervalo P-R | 0.06 – 0.13 sec |
| Complejo QRS (valores máximos aceptados) | 0.06 sec 2.5 mV |
| Intervalo Q-T | 0.15-0.25 sec |
| Segmento S-T | Sin depresión: No mayor de 0.2 mV Sin elevación: No mayor de 0.15 mV |
| Onda T | Puede ser positiva, negativa ó difásica. Amplitud \leq 25% de la Onda R |