



***PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi* EN PERROS DEL
MUNICIPIO DE LA MESA CUNDINAMARCA***

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTA. D.C., 2018



***PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi* EN PERROS DEL
MUNICIPIO DE LA MESA CUNDINAMARCA***

LIANA KATHERINE DIAZ RODRIGUEZ

ASESOR INTERNO

DR. ORLANDO ALFREDO TORRES GARCÍA

D.M.V., M.Sc., Ph.D.

ASESOR EXTERNO

YULY ELIEN BERNAL ROSAS

M.Sc.,

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

BOGOTA D.C., 2018

DEDICATORIA

A:

Dios, por darme la oportunidad de vivir, por estar conmigo en cada paso que doy, por cada uno de los recuerdos, alegrías, victorias y fracasos que forman parte de mi vida, por iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía.

mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su incondicional apoyo, por su amor y su compañía constante en cada situación compartiendo mis angustias y alegrías motivándome para que me supere día a día, gracias a ellos y sus grandes esfuerzos hoy se culmina este sueño forjado con anhelos y esperanza, todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

mis hermanas y hermano, que siempre fueron y serán mis cómplices, infinitas gracias por todo el apoyo, por cada voz de aliento y consejo, siempre los llevo en mi corazón.

mis amigos y profesores, que participaron en esta etapa de mi vida gracias por cada experiencia y conocimiento adquirido.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Orlando Torres y la Dra. Yuly Bernal, quienes con su apoyo incondicional lograron hacer posible la elaboración de este proyecto, por su dirección, por brindarme una parte de sus conocimientos y de su confianza, Toda mi gratitud por su infinita paciencia, profesionalidad, esfuerzo y dedicación. Su labor quedará grabada en mi memoria.

Así mismo agradezco a la Universidad Antonio Nariño, por su acogida y formación en este proyecto que culmina, mi más sincero reconocimiento.

Agradecer a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, alma mater, que cuenta con excelentes profesionales, personas integras que además de su conocimiento dieron todo de si para moldearnos en el camino de la salud y la ciencia. A la facultad de bacteriología, por su dedicación, entrega y constancia, el camino no ha sido fácil, pero la formación que gané es invaluable. Gracias por todo este tiempo.

FINANCIACIÓN

El presente estudio que hizo parte del macroproyecto de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Antonio Nariño, titulado “DINÁMICA DE LA TRANSMISIÓN DE *Trypanosoma cruzi*, EN ZONAS URBANAS, PERIURBANAS Y RURALES EN LA REGIÓN ANDINA - MODELO MUNICIPIO DE LA MESA CUNDINAMARCA.”, financiado por COLCIENCIAS con código 123365741422 y dirigido por el Dr. Orlando Alfredo Torres García - Ph.D., contó con financiación.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	14
2. JUSTIFICACION.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
4. MARCO TEÓRICO	19
4.1. Historia de la enfermedad de Chagas.....	19
4.2. Chagas en Colombia	20
4.3. Vector.....	22
4.4. Agente etiológico.....	24
4.4.1. Clasificación taxonómica.....	25
4.4.2. Variabilidad intraespecífica	25
4.4.3. Unidades Discretas de tipificación.....	26
4.5. Estadios celulares	27
4.6. Ciclo de vida.....	29
4.6.1. Ciclo Doméstico	30
4.6.2. Ciclo peridoméstico.....	30
4.7. Epidemiología.....	30
4.8. Patogenia	32
4.9. Inmunología de la enfermedad	33
4.9.1. Inmunidad innata.....	33
4.9.2. Inmunidad adaptativa	34
4.9.3. Evasión de la respuesta inmune	34
4.10. Vías de transmisión	36
4.11. Técnicas de diagnóstico	37
5. DISEÑO METODOLÓGICO.....	40
5.1. Materiales y métodos.....	40
5.1.1. Tipo de estudio	40
5.1.2. Selección de individuos.....	40
5.2. Área geográfica	40
5.3. Muestra	41

6. METODOLOGÍA PARA ALCANZAR LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	42
6.1. Metodología para alcanzar el objetivo específico 1.....	42
6.1.1. Análisis serológico	42
6.1.2. Descripción procedimiento para ELISA	43
6.1.3. Descripción procedimiento para IFI.....	43
6.2. Metodología para alcanzar el objetivo específico 2.....	45
6.2.1. Análisis estadístico.....	46
6.3. Metodología para alcanzar el objetivo específico 3.....	47
6.3.1. Obtención de antígenos o proteínas.....	47
6.3.2. Técnica de Western Blot	48
6.3.2.1. Preparación de los geles de poliacrilamida	48
6.3.2.2. Desarrollo de electroforesis:.....	49
6.3.2.3. Electrotransferencia	49
6.3.2.4. Revelado.....	50
7. RESULTADOS.....	51
7.1. <i>Objetivo específico 1: Detectar la presencia de anticuerpos anti-T. cruzi en suero de caninos, mediante Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA) e Inmunofluorescencia Indirecta - (IFI)</i>	52
7.2. <i>Objetivo específico 2: Identificar los factores de riesgo asociados a los habitantes que se encuentran en contacto con los caninos infectados por T. cruzi del municipio de La Mesa - Cundinamarca.</i>	53
7.2.1. Factores de riesgo evidenciados a través de fotografías.....	53
7.3. <i>Objetivo específico 3: Probar una técnica de Western Blot in house, como posible método de diagnóstico confirmatorio de tripanosomiasis.</i>	60
7.3.1. Estandarización técnica Dot Blot.....	62
8. DISCUSIÓN.....	65
9. CONCLUSIONES	68
10. RECOMENDACIONES	70
12. ANEXOS.....	71
13. REFERENCIAS	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales estadios de <i>T. cruzi</i> y sus diferentes características morfológicas	28
Tabla 2. Proporciones de reactivos para preparar geles a una concentración del 7% SDS.....	48
Tabla 3. Descripción sociodemográfica de la población canina	51
Tabla 4. Distribución de la población canina seropositiva	52
Tabla 5. Asociación de zona (Urbana, Periurbana y Rural) frente a perros, zarigüeyas y vectores positivos en la Mesa Cundinamarca	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1a. Principales vectores asociados a la enfermedad de Chagas; 1b. Distribución a nivel nacional de las diferentes especies de triatominos.....	23
Figura 2. Distribución de las especies de triatóminos, en Cundinamarca	24
Figura 3. Clasificación taxonómica de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
Figura 4. Distribución geográfica de las DTU's de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Figura 5. Ciclo de vida del parásito hemoflagelado <i>T. cruzi</i>	29
Figura 6. Papel del estrés nitro-oxidativo derivado del huésped en la infección por <i>T. cruzi</i>	36
Figura 7. Ubicación geográfica del Municipio de La Mesa – Cundinamarca.	41
Figura 8. Panorama de área periurbana del municipio la Mesa Cundinamarca.	53
Figura 9. Tipos de vivienda encontrados en la zona rural del municipio	54
Figura 10. Entornos urbanos relacionados con la presencia de triatominos y zarigüellas	55
Figura 11. Sector periurbano del municipio.....	56
Figura 12. Zarigüeyas capturadas en zonas periurbanas del municipio de La Mesa.	57
Figura 13. Mapa de la Mesa Cundinamarca	58
Figura 14. Porcentaje de distribución por zona de especies animales positivas a <i>T. cruzi</i>	59
Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%.....	61
Figura 16. Ensayo con membranas de nitrocelulosa	63
Figura 17. Tiras de membrana de nitrocelulosa después de transferencia.	64

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Trypanosoma cruzi* es un parásito protozoario hemoflagelado que tiene distribución en el Continente Americano y es el agente causal de la Enfermedad de Chagas, una zoonosis que afecta la cuarta parte de toda la población de América Latina. En Colombia se considera que cerca de 7% de la población está infectada y que aproximadamente el 23 % está en alto riesgo de obtener la infección dependiendo de la distribución geográfica de los vectores. La infección obedece a la existencia de un vector invertebrado (triatóminos) y un reservorio vertebrado (*Canis lupus familiaris*, *Felis silvestris catus*, *Didelphis marsupialis*, *Dasyopus novemcinctus*, *Rattus rattus*, etc.) incluyendo a los humanos. **OBJETIVO:** Se estimó la prevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi* en perros del municipio de La Mesa Cundinamarca. **METODOLOGÍA:** Se realizó un estudio transversal que incluyó 356 perros en el municipio de La Mesa Cundinamarca, para detectar anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*. Se utilizó ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), usando las placas del kit ELISA Chagas III y anticuerpo secundario monoclonal anti-perro IgG-HRP de cabra: sc-2433, y un Kit de prueba de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta (IFI), y una prueba de chi-cuadrado para evaluar los factores de riesgo asociados; odds ratio (OR) e intervalo de confianza (IC) del 95% también fueron estimados. Adicionalmente, se buscó probar una técnica WESTERN BLOT *in house*, como un posible método de diagnóstico confirmatorio. **RESULTADOS:** Se encontraron 105 caninos (*Canis lupus familiaris*) con anticuerpos anti-*T. cruzi* en zona rural, periurbana y urbana del municipio de La Mesa, Cundinamarca. Se encontró una prevalencia de 29.49% (CI_{95%} 24.71- 34.18); el área de residencia se asoció estadísticamente con la seropositividad en perros ($p < 0,05$).

PALABRAS CLAVE: *Trypanosoma cruzi*, caninos, Enfermedad de Chagas, zoonosis, seroprevalencia, Cundinamarca.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Trypanosoma cruzi* is a protozoan hemoflagellate parasite that has distribution in the American Continent and is the causal agent of Chagas Disease, a zoonosis that affects a quarter of the entire population of Latin America. In Colombia, it is considered that about 7% of the population is infected and that approximately 23% are at high risk of obtaining the infection depending on the geographical distribution of the vectors. The infection is due to the existence of an invertebrate vector (triatóminos) and a vertebrate reservoir (*Canis lupus familiaris*, *Felis silvestris catus*, *Didelphis marsupialis*, *Dasybus novemcinctus*, *Rattus rattus*, etc.), including humans. **OBJECTIVE:** The aim of this studied was to detect the prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs from the municipality of La Mesa Cundinamarca. **METHODOLOGY:** A cross-sectional study that included 356 dogs in the municipality of La Mesa Cundinamarca was conducted to detect IgG antibodies anti-*T. cruzi* Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used, using plates from the Chagas III ELISA kit and goat anti-dog monoclonal antibody IgG-HRP: sc-2433, and an indirect immunofluorescence antibody test kit (IFI), and a chi-square test to evaluate the associated risk factors; odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were also estimated. Additionally, we sought to test a WESTERN BLOT in-house technique, as a possible confirmatory diagnostic method. **RESULTS:** 105 canines (*Canis lupus familiaris*) were found with anti-*T. cruzi* antibodies. *T. cruzi* in rural, peri-urban and urban areas of the municipality of La Mesa, Cundinamarca. A prevalence of 29.49% was found (CI 95% 24.71-34.18); the area of residence was statistically associated with seropositive in dogs ($p < 0.05$).

KEYWORDS: *Trypanosoma cruzi*, canines, Chagas disease, zoonoses, seroprevalence, Cundinamarca.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es el desenlace de la infección por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, el cual posee un tropismo por el tejido muscular cardíaco, provocando cardiopatías y patologías mega viscerales en los enfermos crónicos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que unos 18 millones de personas se encuentran infectadas y más de 100 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad (1,2). En Colombia el Instituto Nacional de Salud (I.N.S.) informa que cerca de 700.000 – 1.200.000 personas están infectadas y unos 8.000.000 de individuos se encuentran en riesgo (2,3).

T. cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un hemoflagelado heteroxénico que desarrolla su ciclo de vida en ocho órdenes de mamíferos, y en más de 140 especies de insectos estrictamente hematófagos (*Hemíptera*, *Reduviidae*, *Triatominae*), y la mayoría de estos actúan como vectores, siendo *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius* los géneros de mayor importancia epidemiológica en Colombia (4). En Cundinamarca, se ha visto que las especies con mayor frecuencia son *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus geniculatus* (5).

Según el I.N.S., en el ciclo de la enfermedad de Chagas se encuentran actuando como reservorios el hombre y más de 150 especies de animales domésticos y salvajes, que incluyen perros, gatos, ratas, ratones y otros animales domésticos; además, marsupiales, desdentados, roedores, quirópteros, carnívoros y primates (2). Algunos estudios muestran que la probabilidad de estar infectado con el parásito aumenta de tres a cinco veces cuando se convive con animales infectados, en comparación con individuos que viven con animales sin infección (6).

Este estudio se enfoca en los caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*), mamíferos sinantrópicos, que son considerados uno de los principales reservorios para la infección en humanos, debido principalmente a la afinidad existente entre vector y reservorio. Las condiciones nutricionales deficientes en los animales atenúan su sistema inmunológico ofreciendo una respuesta baja al agente infeccioso y contribuyendo a las altas parasitemias (7).

Se ha descrito que los perros son una fuente de alimentación auxiliar para los redúvidos (Sustantivo masculino con el significado de insecto hemíptero familia entomológica de las chinches) sugiriendo una mayor cantidad de triatóminos infectados (8,9) y una mayor prevalencia de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana (8,10,11). En este sentido se ha propuesto que el éxito reproductivo de los triatóminos se ve favorecido por la alimentación primaria de sangre de animales domésticos (9), así como también se ha demostrado que la prevalencia de infección por *T. cruzi* en perros aumenta con la edad (6).

Del mismo modo, estudios previos (6,10) demuestran la utilidad de los perros como indicadores de la transmisión activa de la enfermedad en áreas endémicas, debido a la similitud en el cuadro clínico y patológico con el humano, asociados a otros factores como el territorio definido, proximidad con el ser humano, facilidad al momento del conteo, captura, y la posibilidad de efectuar muestreos representativos (11).

Según el ministerio de salud y protección social, en Colombia, la infección por *T. cruzi* se ha detectado a lo largo del Valle del río Magdalena, en la región del Catatumbo, la Sierra Nevada de Santa Marta, el piedemonte de los Llanos Orientales y la Serranía de la Macarena. Departamentos con mayor endemia son: Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Casanare y Arauca y más recientemente en comunidades de la Sierra Nevada de Santa Marta (3).

En el municipio de La Mesa, Cundinamarca a pesar de ser una zona endémica para el vector y el parásito (12) no se han realizado estudios epidemiológicos tripanosomiasis en perros (*Canis lupus familiaris*); por tal razón, este estudio buscó determinar la prevalencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en perros de las zonas urbanas, periurbanas y rurales del Municipio de La Mesa, Cundinamarca, Colombia.

2. JUSTIFICACION

Los caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*), mamíferos sinantrópicos (Definidos como la capacidad de algunas especies para habitar en ecosistemas urbanos) son uno de los principales reservorios domésticos para la infección en humanos (7). Según Manrique D., y col., la presencia de caninos infectados aumenta el riesgo de transmisión a los vectores y de esta manera la probabilidad de infección de los humanos; en este sentido se considera que el perro es un agente amplificador de la parasitosis, debido a que es un mamífero que convive en cercanía con los seres humanos, y es incapaz de evitar la picadura de los insectos vectores, éste se convierte en un reservorio activo del *Trypanosoma cruzi*. Lo anterior otorga un importante papel epidemiológico a los perros, respecto a otros animales silvestres (13).

Estudios realizados en diferentes regiones de Colombia han mostrado seroprevalencias en perros superiores al 27% (13). Resultados obtenidos en investigaciones en el municipio de Amalfi (Antioquia) donde se evaluó la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en perros y reservorios peridomésticos, se reportó una seroprevalencia en perros del 50% y en animales peridomésticos del 20%. Por otro lado, un estudio en la región Momposina, ubicada entre los departamentos de Magdalena y Bolívar, el porcentaje de los perros como reservorios domésticos infectados con *T. cruzi* fue de 15,1% (14), adicionalmente en un estudio realizado en el departamento de Boyacá, se encontró una prevalencia del 16.7% en Moniquirá y del 13.3% Miraflores, con una prevalencia global de 15% en los dos municipios, demostrando una alta prevalencia de la enfermedad en estos mamíferos a nivel nacional, siendo estos animales catalogados con frecuencia, víctimas silenciosos de la infección (13).

Se ha demostrado que los caninos son de gran importancia en el ciclo de transmisión de *T. cruzi* en el ambiente domiciliario y peridomiciliario, pues al estar en medio rural el perro puede desplazarse de un lugar a otro dentro de la misma localidad, además de estar expuestos a la infección mediante la caza o alimentación de animales silvestres y triatóminos infectados (15,16). Según reporta el Ministerio de Salud y Protección Social y la Federación Médica Colombiana, Cundinamarca es uno de los

departamentos con mayor endemia de Chagas en Colombia (3); razón por la cual se plantea la siguiente pregunta ¿Cuál es la prevalencia de infección a *Trypanozoma cruzi* en perros (*Canis lupus familiaris*) del municipio de La Mesa – Cundinamarca?

En el año 2015 Colombia se reportó un acumulado de 877 casos Chagásicos humanos, donde el 96,5% eran casos crónicos y 3,5% casos agudos, mostrando un aumento del 2,6% en relación con el año 2014. El departamento de Cundinamarca ocupa el noveno puesto con más casos confirmados según el boletín epidemiológico del SIVIGILA numero cincuenta y dos, el último del año 2016 (17). Para el año 2017 el último boletín hasta la fecha corresponde a la semana 32 y se ha notificado al SIVIGILA 21 casos a nivel nacional, el último reporte completo es el de la semana epidemiológica 25 del presente año y reporta el ingreso de 473 casos, 19 en fase aguda (seis probables, 13 confirmados) y 454 casos en fase crónica (371 probables y 105 confirmados pertenecientes a los departamentos de Boyacá, Santander, Casanare, Bogotá y Cesar). Basados en estos datos obtenidos por el SIVIGILA, se confirma que el departamento de Cundinamarca posee alta prevalencia de Chagas en humanos (17), razón por la cual es importante establecer los caninos seropositivos para Chagas pues, según un estudio realizado en Venezuela sugiere que el humano por su mayor expectativa de vida, sería el reservorio responsable de la alta prevalencia de la infección en los caninos (18), convirtiéndolos en un indicador o centinela de la trasmisión activa de la enfermedad en las áreas controladas (18,19).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Estimar la prevalencia de infección a *Trypanosoma cruzi* en perros del municipio de La Mesa Cundinamarca.

3.2. Objetivos específicos

1. Detectar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en suero de caninos, mediante Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA) e Inmunofluorescencia Indirecta - (IFI)
2. Identificar los factores de riesgo asociados a los habitantes que se encuentran en contacto con los caninos infectados por *T. cruzi* del municipio de La Mesa - Cundinamarca.
3. Probar una técnica de Western Blot *In-house*, como posible método de diagnóstico confirmatorio de tripanosomiasis.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Historia de la enfermedad de Chagas

Hacia el año 1907 el médico brasileiro, Carlos Ribeiro Justiniano Das Chagas comienza sus estudios en Lassance una comunidad de Brasil donde descubre en el intestino de un insecto (*Panstrongylus megistus*) una nueva especie de tripanosomátido que denominó *Trypanosoma cruzi* en honor a su maestro Oswaldo Cruz, más tarde descubrió el agente en la sangre de un gato y poco después, en el de una niña que convivía con el animal (20). En el laboratorio de su maestro Oswaldo Cruz logra reproducir la infección y tras numerosos experimentos entre insectos y monos (*Calletox penicillata*) tuvo éxito en la identificación del parásito y descubrió que éste podría infectar a la especie humana. Dos años más tarde Carlos Chagas lanza una serie de publicaciones donde reporta la descripción aguda de la enfermedad, la morfología y ciclo de vida completo del parásito (21).

Dentro de sus avances en la investigación de la enfermedad, el doctor Chagas genera una nueva hipótesis, gracias a su experiencia y conocimiento, propone la posibilidad de desarrollar una fase crónica de la enfermedad, adopta esta idea guiándose por la sintomatología de sus pacientes, tales como trastorno del ritmo cardiaco, extrasístoles y bradicardia (20). Gracias al descubrimiento del patólogo Movina el cual pudo observar la presencia de *T. cruzi* a nivel de tejido cardiaco se pudo fundamentar la hipótesis del investigador Chagas, justificando uno de los síntomas más frecuentes de la enfermedad: La alteración del ritmo cardiaco. (22).

Otro de los grandes investigadores que aportó descubrimientos para establecer la enfermedad de Chagas fue el Dr. Salvador Mazza, investigador médico en enfermedades infecciosas, bacteriólogo y parasitólogo, fue uno de los primeros en estudiar la enfermedad de Chagas en la República Argentina, realizó profundas investigaciones en tripanosomiasis, abarcando dentro de su investigación vectores, animales domésticos,

silvestres y casos humanos de la enfermedad (23). En 1934, el mismo año del fallecimiento de Carlos Chagas, Salvador Mazza, comunicaba la existencia de varios casos en el Chaco argentino (24). Gracias a estas publicaciones se valorizó científicamente el trabajo que había realizado el doctor Chagas (22).

El científico Emmanuel Días dedicó gran parte de su tiempo al estudio de *T. cruzi*, estuvo a cargo del Centro de Investigaciones Minas Gerais, en Bambui Brasil, donde se desarrollaban estudios acerca de la fase aguda y crónica de la enfermedad (25). Gracias al avance en la tecnología mediante las técnicas serológicas y electrocardiográficas Emmanuel Días demostró el impacto médico y social de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica, un mal que afecta a millones de personas. Finalmente es entre los años 70 y 80 que inician los programas para el control de la enfermedad enfocándose en el mejoramiento de las viviendas y la lucha química de los vectores (triatominos) (20,23).

4.2. Chagas en Colombia

Se ha reportado el hallazgo de *Trypanosoma cruzi* en momias de más de cuatro mil años de antigüedad en América, lo que demuestra que la existencia de la enfermedad de Chagas proviene desde tiempos prehistóricos (26), hay que resaltar que el Chagas es una enfermedad silenciosa que puede ser mortal, pero que la mayoría no sabe que padece, sin embargo han sido pocos los estudios realizados en el pasado en cuanto a esta afección en nuestro país, ya que siempre fue mal considerada como una enfermedad que afecta a los niveles económicos más bajos, pasando a ser por este motivo una de las enfermedades olvidadas (27).

En Colombia se observa por primera vez el hemoflagelado causante de la enfermedad en 1939 en la ciudad de Cali, y en 1947 se registraron estudios sobre la enfermedad de Chagas, donde J. Caicedo y C. Hernández escribieron un informe inicial sobre los primeros casos crónicos de la enfermedad de Chagas comprobados en Colombia, los cuales eran procedentes de Fusagasugá, Cundinamarca (26,28).

Marcos Duque fue uno de los pioneros en iniciar investigaciones sobre la cardiopatía Chagásica del país en el año 1961. Años más tarde el investigador Hernando Rocha reporta la presencia de mega esófago como consecuencia de la enfermedad (26), en interés de seguir investigando con respecto a esta enfermedad se fundó en asociación con la Universidad Industrial de Santander el Centro de Investigaciones de Endemias Tropicales en los años noventa y desde entonces el departamento de Santander ha logrado grandes avances en este campo de investigación (29).

En el año 1992 se realizó un estudio con fines investigativos, patrocinado por la Organización Mundial de la Salud, realizado por la Universidad de los Andes, el Instituto Nacional de Salud y la Cruz Roja Nacional, cuyos resultados mostraron altos índices de seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en donantes de sangre a nivel nacional, por esta razón el Ministerio de Salud estableció la resolución 1738 del 30 de mayo de 1995, la cual hace obligatorio el uso de pruebas de tamizaje a todos los donantes en bancos de sangre a nivel nacional. En la actualidad existe una cobertura del 100%, se exige además la remisión de todos los pacientes seropositivos a los servicios de salud (30).

Al observar la situación anterior, finalizando el año de 1995 el ministerio crea un plan estratégico para el diseño del programa nacional de prevención y control de la enfermedad de Chagas, el cual es puesto en marcha el mes de octubre de 1996 donde se inició con un seminario-taller para brindar asesoría en programas de prevención y control a las direcciones seccionales de salud de los departamentos donde se presenta alta, endemia de esta parasitosis (30,31).

Finalmente, a partir de 1997 se implementa el Programa de Prevención y Control de la infección por *Trypanosoma cruzi* a nivel nacional, como medida de protección contra la enfermedad de Chagas, dividido en fase exploratoria para verificar la situación epidemiológica de infección por *T. cruzi* en todo el territorio y fase de promoción, prevención y control para interrumpir la transmisión vectorial (31).

En el año 2002 el programa cumplió en su fase exploratoria con la cobertura de 55% del total de área endémica del país (62% de la población en riesgo) y para el ese mismo año fueron asignados los fondos para el cubrimiento del resto del área endémica. Se intervinieron 25.000 viviendas con insecticidas piretroides de prolongado efecto residual (31,29).

En la década pasada se observó que los programas de lucha contra la enfermedad puestos en marcha en varios países endémicos mostraron un descenso importante de la incidencia de la enfermedad de Chagas en América Latina. Sin embargo, en los países de la región andina y de Centroamérica todavía se encuentran 8-10 millones de personas infectadas por el parásito y 25 millones siguen en riesgo de infectarse, aún existe la necesidad de implementar estrategias de lucha contra la enfermedad que sean efectivas (32).

4.3. Vector

Los triatominos (Hemiptera: Reduviidae) son insectos chupadores de sangre distribuidos a nivel nacional (Figura 1a, 1b), vectores del protozoo *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana (32).

Clasificación taxonómica

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

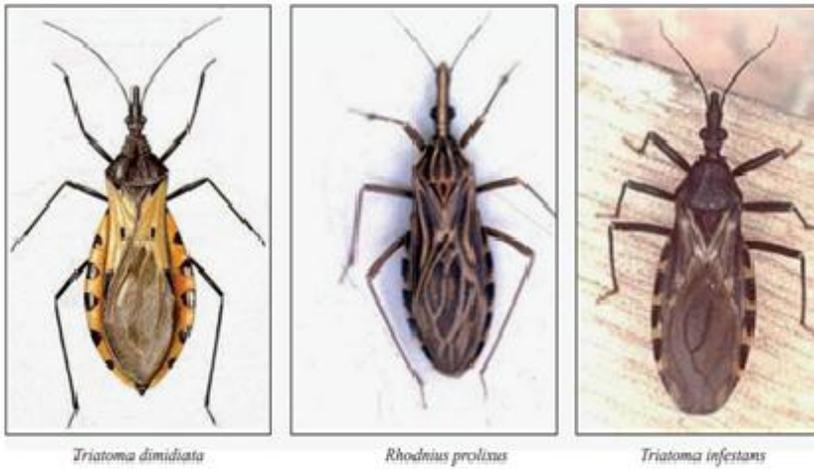
Orden: Hemiptera

Suborden: Heteroptera

Familia: Reduviidae

Subfamilia: Triatominae

1a.



1b.



Figura 1a. Principales vectores asociados a la enfermedad de Chagas. Guhl, F. 2009 (29). 1b. Distribución a nivel nacional de las diferentes especies de triatominos. Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Biomédica vol.27. 2007. (82)

El *Trypanosoma cruzi* se transmite a través del contacto con insectos triatominos de hábitos nocturnos, quienes para alimentarse introducen su probóscide directamente en los vasos sanguíneos de los huéspedes vertebrados, y de esta manera constituyen el principal mecanismo de transmisión de la enfermedad en la naturaleza (29,32). Se han reportado 25 especies de triatominos en el país y en 16 de estas especies se encontró *T. cruzi*. *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* son las especies más comunes y vectores principales en Colombia (33,5). En la Figura 2 se muestra la distribución de estas especies en el departamento de Cundinamarca.

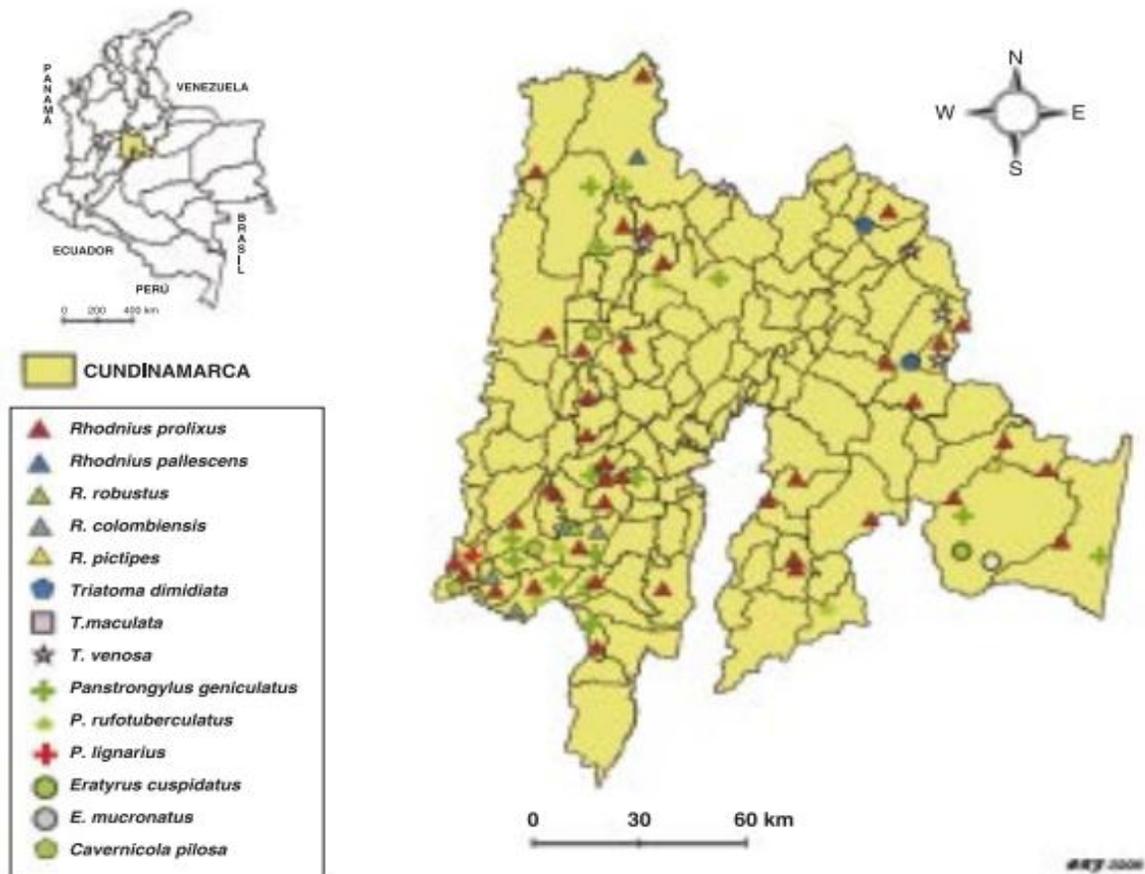


Figura 2. Distribución de las especies de triatóminos, en el departamento de Cundinamarca. Guhl F., Aguilera G., Pinto N., Vergara D. 2007 (5)

4.4. Agente etiológico

El parásito *Trypanosoma cruzi* es un protozoo perteneciente al filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, suborden Trypanosomatida y familia Trypanosomatidae. Este microorganismo tiene un organelo que lo caracteriza, denominado cinetoplasto, en este lugar se alberga el DNA o KDNA quien se encuentra estructurado por moléculas ideadas en forma de maxicírculos y minicírculos (31). La forma básica de *T. cruzi* es en “U” o media luna, su borde anterior es alargado mientras que el posterior es redondeado, posee una membrana ondulante bordeada por un flagelo que se inicia en el cinetoplasto (34).

4.4.1. Clasificación taxonómica

T. cruzi se encuentra clasificado de la siguiente manera, descrita por Levine y colaboradores en 1980 (Figura 3)

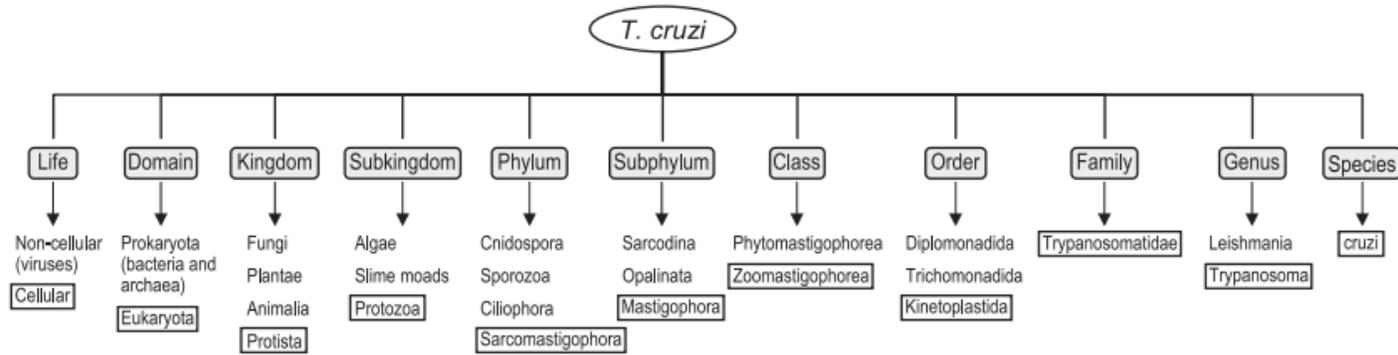


Figura 3. Clasificación taxonómica de *Trypanosoma cruzi*. Tomado de Rassi, y col, 2012 (83)

4.4.2. Variabilidad intraespecífica

T. cruzi es una especie heterogénea compuesta por una amplia población de cepas o aislados que circulan entre los hospederos mamíferos e insectos vectores. La heterogeneidad del parásito ha sido ampliamente estudiada, lo que ha dado lugar a la clasificación del parásito según características biológicas (Biodemas), bioquímicas (Zimodemas) y moleculares (Linajes, grupo, DTU) de las cepas. Es importante hacer esta clasificación, porque esta heterogeneidad de la especie influye sobre el tropismo celular, la presentación clínica de la enfermedad, el ciclo de transmisión y la terapia antiparasitaria (84, 85).

Biodemas: Basados en las observaciones del comportamiento biológico y morfológico en algunos aislados de *T. cruzi* en modelos animales, se propuso la clasificación mediante estos en biodemas. El biodema I, constituido por aislados de rápido crecimiento in vitro, alta parasitemia y mortalidad en el modelo murino, las formas infectivas tripomastigotas se caracterizan por ser delgadas, con extrema virulencia y tropismo por células del sistema fagocítico. Por otro lado, los aislados del Biodema II están constituidos de formas infectivas gruesas, miotrópicas, de baja virulencia, crecimiento lento in vitro y picos de

parasitemias irregulares. Mientras que, el Biodema III es típico en los aislados colombianos, además son de multiplicación lenta y con picos de parasitemia retardados, hasta de 20 a 30 días post-inoculación en los ratones y baja mortalidad hasta de 50 días post-infección, las formas infectivas son morfológicamente gruesas y con tropismo por el músculo esquelético (85).

Zimodemas: La caracterización bioquímica de *T. cruzi* en base a las isoenzimas permitió determinar diferentes perfiles, dando lugar a la clasificación en tres Zimodemas denominados Z1, Z2 y Z3, de los cuales el Z1 prevalece en los hábitats domésticos y selváticos en regiones del norte de la amazonia, los aislados Z2 están correlacionados con el ciclo de transmisión doméstica en los países del cono sur, mientras que los del Z3 están asociados al ciclo de transmisión silvestre en la región amazónica (86, 87, 88, 89).

4.4.3. Unidades Discretas de tipificación

Trypanosoma cruzi puede clasificarse en seis unidades discretas de tipificación (DTU) TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI (35), basados en estudios bioquímicos y genéticos, siendo los grupos TcI y TcII los más antiguos, el primero es endémico en Centro América y norte de Sur América mientras que el segundo causa la enfermedad Chagas en los países del Cono Sur. Investigaciones realizadas destacan mayor prevalencia de TcI en Colombia, sin embargo, TcII, TcIII, TcIV también ha sido reportado en pacientes Chagásicos (36,37), figura 4.

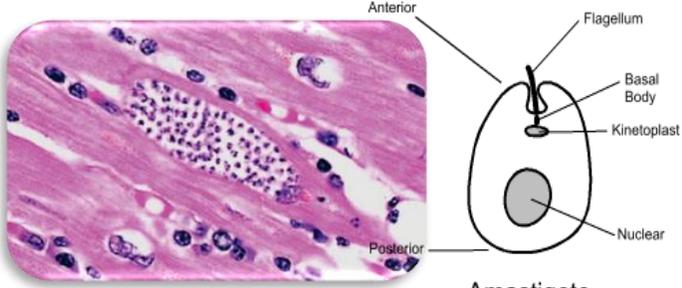
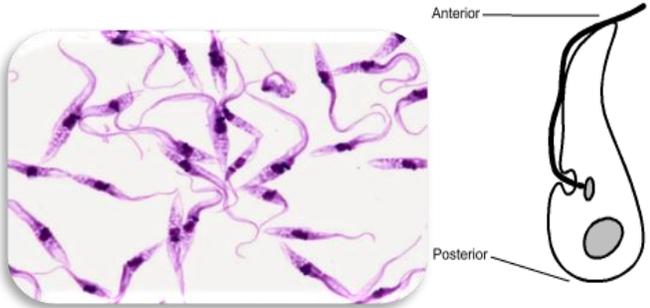


Figura 4. Distribución geográfica de las DTU's de *Trypanosoma cruzi* en el Continente Americano. Tomado de Patterson y Guhl, 2010 (73)

4.5. Estadios celulares

T. cruzi cumple su ciclo de vida en dos huéspedes, invertebrados (triatóminos) y vertebrados (humanos, perros, gatos, ratones etc...); presenta tres principales estadios dentro de su ciclo de vida: amastigote, epimastigote, y tripomastigote, distinguiéndose cada uno de ellos por la posición del cinetoplasto en relación con el núcleo y por la presencia o no de membrana ondulante (10,38) Tabla 1.

Tabla 1. Principales estadios de *T. cruzi* y sus diferentes características morfológicas (10, 38, 39, 40)

PRINCIPALES ESTADIOS CELULARES DE <i>T. cruzi</i>	
<p>Amastigotes: Son las formas intracelulares replicativas que se hallan en los tejidos (principalmente en células musculares y nerviosas).</p>	 <p style="text-align: center;">Amastigote</p>
<p>Epimastigote: Es la forma extracelular y replicativa presente en el intestino medio de los triatomíneos y en medios de cultivos (cinetoplasto localizado con anterioridad al núcleo)</p>	 <p style="text-align: center;">Epimastigote</p>
<p>Trypomastigote: Es la forma extracelular en la sangre de los mamíferos, también se encuentra en intestino terminal de los vectores y sus deposiciones, es la forma infectante (cinetoplasto localizado posteriormente al núcleo, presencia de membrana ondulante)</p>	 <p style="text-align: center;">Trypomastigote</p>

4.6. Ciclo de vida

El insecto (triatomino) obtiene el parásito en la forma de tripomastigote circulante al momento de alimentarse de sangre de un mamífero infectado (41), los tripomastigotes pasan al intestino medio transformándose en epimastigotes (forma replicativa en el invertebrado). Posteriormente por división (fisión binaria) se vuelven tripomastigotes metacíclicos (formas infectantes) alojados en el intestino posterior donde pueden conservarse por meses o de por vida; esta forma evolutiva alojada en las heces del insecto son las encargadas de infectar los tejidos del huésped (digestivo, retículo endotelial y muscular principalmente). Ya alojado en la célula, el parásito por fisión binaria muda a amastigotes (forma replicativa intracelular) y posteriormente a tripomastigotes sanguíneos, este último rompe las células y circula en sangre infectando otros tejidos o siendo absorbidos por el insecto (vector), reiniciando así su ciclo de vida (38,42) figura 5.

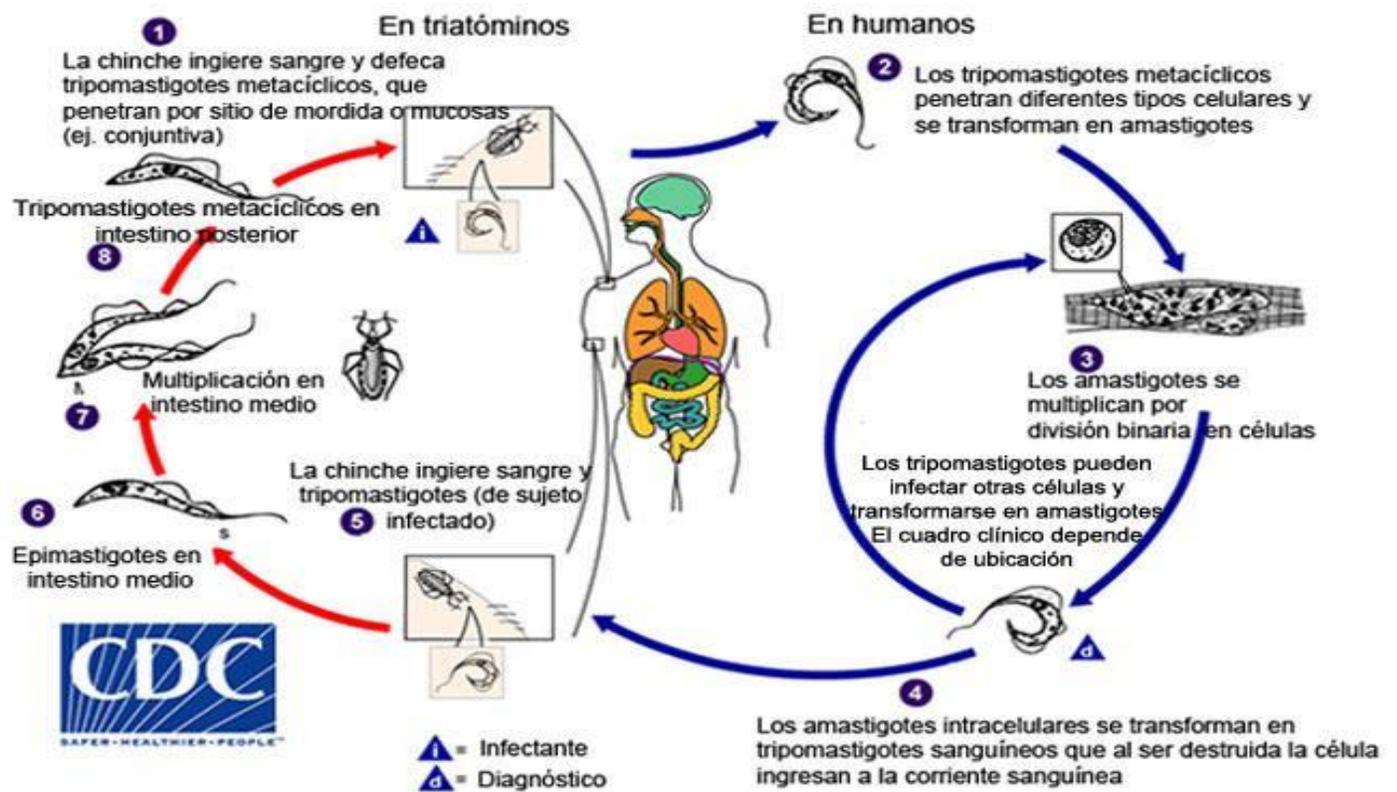


Figura 5. Ciclo de vida del parásito hemoflagelado *T. cruzi*. Disponible en: <http://uip.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html>

4.6.1. Ciclo Doméstico

Los triatominos, que son predominantemente hematófagos, pueden encontrarse en algunos alojamientos de humanos, donde encuentran una situación favorable para su existencia, volviéndose insectos domiciliarios; siendo entonces la transmisión vectorial el principal modo de transmisión de la tripanosomiasis americana (42,43,44).

4.6.2. Ciclo peridoméstico

Ciertas especies de triatominos se albergan en zonas aledañas a la vivienda de las personas como techos, gallineros, chiqueros, atillos alimentándose de la sangre de los animales domésticos que allí convivan (42,43,44).

4.7. Epidemiología

La enfermedad de Chagas se establece como una zoonosis transmitida principalmente de forma vectorial (70 a 90 % de los casos). De las 141 especies de triatominos descritas a la fecha, aproximadamente, 125 son exclusivas de América, 26 se han reportado en Colombia y 15 se han encontrado naturalmente infectadas con *T. cruzi* (45), sin embargo, existen otras vías de transmisión en menor medida, transfusional (1 a 20 %), congénita (0.5 a 10 %) (46) e incluso alimentaria tras el consumo de heces o triatominos infectados con *T. cruzi* (47,48,49).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha estimado que de los 360 millones de personas que viven en países endémicos, 90 millones corren el peligro de contraerla y de 16 a 18 millones ya están infectados, y en un futuro podrían sufrir daños cardiacos, gastrointestinales y neurológicos; es así como la enfermedad de Chagas es considerada como la cuarta causa de mortalidad en América Latina, provocando unas 43000 muertes cada año (50). Se estima que más de 100 especies de animales salvajes son portadores de tripanosomas con evidencia clínica casi nula; inicialmente los marsupiales eran los portadores de *T. cruzi* pero fue transmitido a otras especies

animales a través de los triatominos, quizás el proceso de adaptación por parte de *T. cruzi* a otros huéspedes dio origen a linajes clonales y con el fin de esclarecer la estructura de las poblaciones de *T. cruzi*, se llegó a un acuerdo para establecer las seis unidades de tipificación discreta (UTD), agrupadas entre TcI y TcVI (42,51,52), en Colombia, Brasil y Bolivia se ha demostrado una estrecha relación entre el genotipo TcII y el ciclo doméstico (53) sin embargo otros autores destacan la relatividad de esta asociación (54), sin mientras que el genotipo TcI se encontró en el ciclo silvestre y se ha demostrado también que este último circula en la zonas norte y centro de América (53), el genotipo TcI es el de la mayor distribución en Colombia (55).

Se estima que en el continente americano cerca de 100 millones de personas están en riesgo de infectarse, unos 8 millones infectadas, con 56.000 nuevos casos anuales por todas las formas de transmisión, causando 12.000 muertes anuales (56).

En Colombia se considera que alrededor de 700.000 a 1.200.000 habitantes se encuentran infectados (7%) y 8.000.000 (23%) están en riesgo de adquirir la infección (12). La prevalencia de la enfermedad de Chagas aguda no ha sido documentada muy bien, a pesar de la existencia del SIVIGILA, quizás existe un desconocimiento por parte de las autoridades competentes, para el año 2005 se estimaba que el número de personas infectadas en zonas endémicas de Colombia era de 4.792.000 (2).

De acuerdo a una encuesta entomológica con el fin de evaluar la seroprevalencia y factores de riesgo a nivel nacional se encontraron que los principales vectores adaptados al hábitat humano: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma venosa* y *Triatoma maculata*, *Panstrongylus geniculatus* (12); en Colombia se han reportado 23 especies de triatominos de las cuales 15 se han encontrado naturalmente infectados con *Trypanosoma cruzi*, encontrándose principalmente en los departamentos de Arauca, Boyacá, Cundinamarca, Santander, Norte de Santander (5).

En el departamento de Cundinamarca, específicamente hablando del municipio de La Mesa, se reporta la presencia de *P. geniculatus*, *R. prolixus*, *R. colombiensis*, (12).

Son numerosas las especies que actúan como reservorios para *T. cruzi*, cerca de 150 especies tales como la zarigüeyas, armadillos, roedores, felinos, zorros, caninos, murciélagos, osos hormigueros, primates entre otros (57,4); los perros manifiestan altas prevalencias y figuran como un importante reservorio para la infección en humanos además se convierten en especies importantes para evaluar la dinámica de transmisión de *T. cruzi* en zonas endémicas para el parásito debido a la susceptibilidad de la enfermedad; la manifestación medible al agente etiológico; territorios definidos; facilidad de enumerar y capturar y la población permite muestreos representativos (58,7,59,10).

4.8. Patogenia

La enfermedad de Chagas no se contagia mediante el contacto casual, el parásito se puede transmitir por la sangre o al entrar en contacto directo con los tejidos, es así como los carnívoros se pueden infectar si ingieren tejidos contaminados con *T. cruzi*. Muchas especies animales incluidos los perros, pueden servir como huéspedes amplificadores e infectar a los insectos vectores. En algunos animales, también puede presentarse la transmisión vertical (13,60).

La sintomatología en perros presentan una forma clínica similar a la del hombre; la fase aguda (Duración: 10 – 30 días) afecta principalmente perros menores de uno o dos años, manifestando insuficiencia cardiaca derecha y esplenomegalia generalizada; durante el periodo de incubación el canino presenta fiebre moderada, edema palpebral (no en todos los casos) depresión, letargo, adenopatías, anorexia, diarrea, ascitis; luego pasa a la forma indeterminada que puede durar varios años sin manifestaciones clínicas en el animal (9,50).

En la forma crónica baja la parasitemia en la circulación y desaparecen los síntomas presentándose insuficiencia cardiaca congestiva, eventualmente desarrollan una miocarditis crónica con dilatación cardiaca provocando muerte súbita; en algunos casos el corazón se encuentra bilateralmente agrandado y flácido, con reducción del grosor en algunas áreas de las paredes ventriculares. También se han registrado casos

atípicos sin lesiones cardíacas (60), inclusive se ha evidenciado patologías megas viscerales (megacolon, megaesófago) asociadas a infecciones por *Trypanosoma cruzi* en etapas crónicas (60,61).

4.9. Inmunología de la enfermedad

La interacción que realiza el parásito con la membrana celular parte y genera la primera línea de defensa, está inducida por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos así como la liberación de citoquinas que contribuyen a esta respuesta IL 1, IL 6, IL 12, TNF, bradikinas, y prostaglandinas, contribuyendo a la formación de una respuesta inmune inflamatoria localizada. Si esta logra ser eficiente para eliminar el parásito la inflamación disminuye y el tejido afectado regresa a su condición original. Seguido a esto se desarrolla una respuesta inmune de memoria y una efectora. Logrando limitar el daño y recuperar el tejido, estas respuestas deben mantener un equilibrio, si la respuesta reguladora es excesiva no se elimina el patógeno y si por el contrario es disminuida se presenta daño tisular (74, 75, 76, 77).

Si las respuestas mencionadas no logran acertar eficientemente en la eliminación del parásito este presentará mecanismos de evasión, ya que se ha descrito en el *T. cruzi* antígenos similares a los del huésped, este los libera formando complejos antígeno anticuerpo y es así como logra evadir la respuesta inmunitaria. Además de tener procesos que modifican su antigenicidad, logrando alterar las respuestas celular y humoral (74, 78).

4.9.1. Inmunidad innata

Una vez el parásito pasa de la epidermis, penetra a las células o es fagocitado por macrófagos tisulares. En el interior de ellos se transforma en amastigote y luego a tripomastigote que lisa la célula liberándose al espacio intersticial y diseminándose por todo el organismo, originando un cuadro clínico que varía desde inaparente (el paciente

no tiene sintomatología evidente), a un cuadro agudo con sintomatología importante, parasitemia evidente y respuesta inflamatoria (79).

4.9.2. Inmunidad adaptativa

La respuesta inmune mediada por células tiene un proceso de maduración. Después de la interacción entre los PAMPs y las células presentadoras de antígenos, los epítopes antigénicos son presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad I o II a los linfocitos T. Los linfocitos T que reconocen los epítopes presentados, junto con moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40, son estimulados y en presencia de un ambiente de quimiocinas y citocinas se convierten de linfocitos Th 0 a linfocitos Th1 o Th2 (80).

4.9.3. Evasión de la respuesta inmune

Para establecer una infección de por vida, *T. cruzi* debe subvertir el sistema inmune del huésped vertebrado, utilizando estrategias que pueden rastrearse hasta el ciclo de vida del parásito. Una vez dentro del huésped vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos invaden rápidamente una amplia variedad de células hospedadoras nucleadas en un compartimento unido a la membrana conocido como la vacuola parasitófora, que se fusiona con los lisosomas, originando el fagolisosoma. En este compartimento, el parásito se basa en una red compleja de enzimas antioxidantes para protegerse del oxígeno lisosomal y de las especies reactivas del nitrógeno. La acidificación lisosómica de la vacuola parasitófora es un factor importante que permite que el tripomastigote escape del ambiente extremadamente oxidativo del fagolisosoma al citoplasma, donde se diferencia en formas amastigotes. En el citosol de los macrófagos infectados, el estrés oxidativo en lugar de ser perjudicial para el parásito favorece la carga de amastigotes, que luego se diferencia en tripomastigotes del torrente sanguíneo (Figura 6).

Los Tripomastigotes liberados en el torrente sanguíneo tras la ruptura de la membrana de la célula huésped expresan moléculas de superficie, como calreticulina y proteínas GP160, que interrumpen los componentes iniciales y clave de la ruta del complemento, mientras que otros como glucosilfosfatidilinositol-mucinas estimulan los receptores inmunorreguladores, retrasando la progresión de una respuesta inmune protectora. Después de una entrada inmunológicamente silenciosa en la fase temprana de la infección, *T. cruzi* provoca activación de células B policlonales, hipergammaglobulinemia y anticuerpos anti-*T. cruzi* inespecíficos, que son ineficientes en el control de la infección. Además, la coexpresión de varios epítomos relacionados, pero no idénticos, derivados de proteínas superficiales de tripomastigotes retrasa la generación de anticuerpos neutralizantes específicos de *T. cruzi*. Más tarde en la infección, el establecimiento de una respuesta inmune CD8+ anti-*T. cruzi*, centrada en los epítomos inmunodominantes del parásito controla la parasitemia y la infección tisular, pero no elimina completamente el parásito. Este resultado no es perjudicial para el parásito, ya que reduce la mortalidad del huésped y mantiene la infectividad del parásito hacia los vectores de insectos (90)

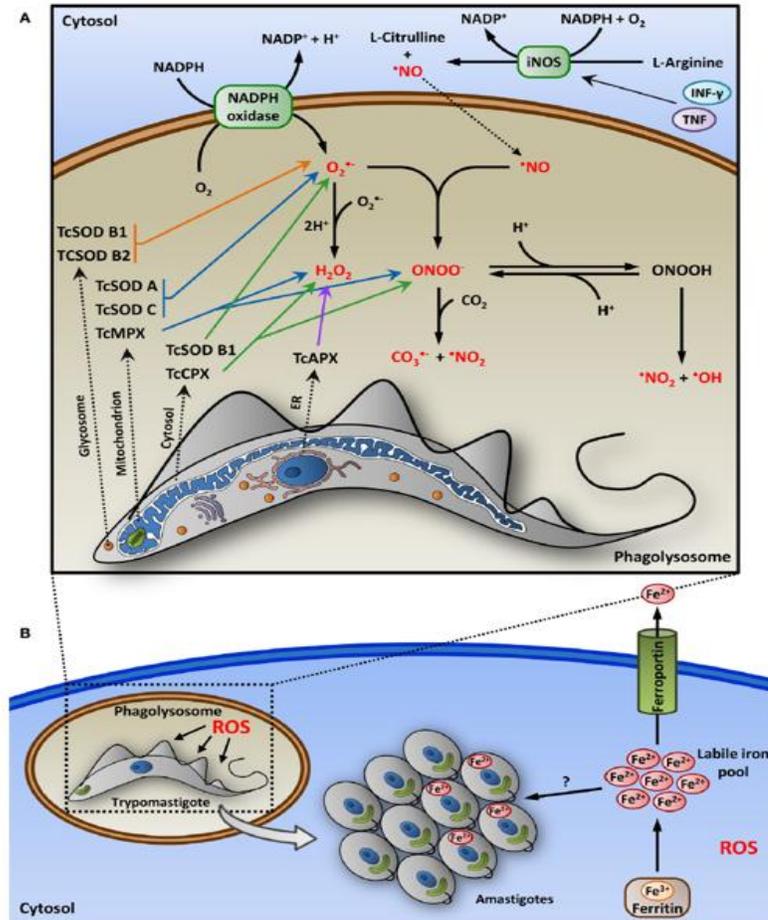


Figura 6. Papel del estrés nitro-oxidativo derivado del huésped en la infección por *T. cruzi*. (90)

4.10. Vías de transmisión

- Vectorsial. En esta vía, el insecto defeca en la piel del hospedero durante la picadura, eliminando formas infectantes, que penetran por el orificio de la picadura al rascado, por ingestión y a través de las mucosas (16).
- Oral. En las especies animales representa uno de los mecanismos más importantes y mucho más efectivo, ya que por instinto el perro toma el insecto con la boca y lo mastica, juntamente con la acción de lamer superficies contaminadas, de esta manera el animal termina contrayendo la enfermedad (44).

- Congénita. En humanos, se considera este tipo de transmisión frecuente en lugares que presentan alta prevalencia de la enfermedad de Chagas; sin embargo, aún no se han adelantado estudios que permitan establecer si este mecanismo de transmisión también puede ocurrir en perros y si constituye un mecanismo amplificador de la infección y de mayor riesgo de infección para los vectores (50,62)

4.11. Técnicas de diagnóstico

En los caninos el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se hace de la misma forma como se hace en humanos, según el protocolo de vigilancia de la enfermedad de Chagas del Instituto Nacional de Salud (2), existen diferentes métodos de diagnóstico, presentados a continuación:

Métodos Parasitológicos Directos. Son aquellos en los que se busca detectar la presencia del parásito mediante observación directa del tripomastigote metacíclico en sangre y están indicados en el diagnóstico de la fase aguda de la enfermedad, principalmente cuando el paciente está febril y la parasitemia es elevada. Incluye los siguientes métodos:

- Examen directo de sangre fresca: Se toma una gota de sangre por punción, se coloca entre lámina y laminilla y se observa al microscopio de luz con objetivo de 10X y 40X. Se buscan tripanosomas moviéndose vigorosamente. Es un método muy sencillo que puede realizarse en un laboratorio con recursos mínimos.
- Frotis o Extendido de sangre periférica: Después de obtener una muestra de sangre por punción capilar, se extiende una gota sobre una lámina coloreada con Romanowski modificado, Giemsa o Wright. Se buscan los tripomastigotes metacíclicos fijados, con sus estructuras características: forma alargada en C o en S, con núcleo, cinetoplasto, flagelo y membrana ondulante. Es una prueba que permite identificar la morfología del parásito, pero presenta baja sensibilidad.

- Gota Gruesa: Es una técnica que utiliza métodos de coloración como los anteriormente mencionados para visualizar el parásito, pero con la ventaja que permite concentrar varias capas de sangre, 20 a 30 en relación con el extendido de sangre.

Métodos parasitológicos indirectos. El xenodiagnóstico y el hemocultivo de *T. cruzi* son algunos de los métodos parasitológicos indirectos. El principio de estos métodos es mejorar la sensibilidad diagnóstica mediante la multiplicación de los parásitos en el vector (xenodiagnóstico) o en un medio de cultivo apropiado (hemocultivo). La sensibilidad del xenodiagnóstico y el hemocultivo en la fase aguda son similares a los métodos directos llegando al 100% y en la fase crónica son del 20 al 50%.

- Xenodiagnóstico: El procedimiento es artificial cuando la sangre del paciente es extraída por venopunción, heparinizada y colocada en recipientes mantenidos a la temperatura corporal y con membranas finas de látex, a través de las cuales los insectos se alimentan.
- Hemocultivo: Es de gran utilidad en caso de Chagas congénito y en formas agudas de la enfermedad; además es utilizado con frecuencia para incrementar la concentración de los parásitos y obtención de antígeno para el diagnóstico serológico y molecular de la enfermedad de Chagas.

Métodos moleculares. Amplificación de ácidos nucleicos del parásito (PCR) Esta técnica se basa en la amplificación de fragmentos de minicírculos de ADN del cinetoplasto, o de otros ácidos nucleicos del parásito. Este procedimiento para detectar *T. cruzi* puede ser aplicado en muestras de sangre, heces de triatomíneos ó de otros materiales biológicos y permiten obtener una sensibilidad bastante alta.

Métodos Serológicos. Consisten en la detección de anticuerpos (de la clase IgM, IgG) en el suero de los pacientes infectados con *T. cruzi*, generados en el curso de la infección. Los métodos usados son:

- Ensayo inmunoenzimático ligado a enzima (ELISA): Permite observar la presencia de anticuerpos anti-inmunoglobulinas ligados a una enzima que en presencia de su

sustrato forma un producto colorido. Por ser una prueba colorimétrica el resultado es definido por la lectura de la absorbancia o densidad óptica y usualmente cada estuche comercial tiene su forma de calcular el punto de corte, por encima o por debajo del cual las muestras se consideran reactivas o no (63).

- Inmunofluorescencia indirecta (IFI): los anticuerpos presentes en el suero del paciente infectado con *T. cruzi* son colocados sobre una lámina que contiene el antígeno (formas epimastigotes de *T. cruzi*) y son revelados a través de anticuerpos anti-inmunoglobulina humana unidos a fluoresceína. El resultado se visualiza en microscopio de fluorescencia con luz ultravioleta y presentar falsos positivos al presentar reactividad cruzada con otros parásitos como *Leishmania* spp o *Trypanosoma rangeli* (2) Con títulos mayor o igual a 1:32 se considera que la prueba es reactiva. Es la prueba más usada en nuestro país para el seguimiento a los pacientes post-tratamiento.

Las pruebas serológicas se convierten en herramientas útiles en la detección de *T. cruzi* debido a su alta sensibilidad y especificidad en ambas etapas de la enfermedad, la OMS estipula que, para la confirmación de un paciente serológicamente positivo, debe por lo menos dar positivo a dos pruebas serológicas, tanto la IFI como la ELISA han mostrado ser altamente sensibles y específicas (95 -98%) (63).

- Western Blot o WB: Es una técnica utilizada para la detección y caracterización de proteínas que se basa en la especificidad de reconocimiento entre antígeno y anticuerpo. Implica la separación basada en pesos moleculares de las proteínas de una mezcla compleja a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida y una transferencia cuantitativa e irreversible a una membrana. Los antígenos que se han transferido son reconocidos por anticuerpos específicos y son detectados mediante actividad enzimática cromógena (TESA blot), quimioluminiscencia o fluorescencia. (2,64).

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1. Materiales y métodos

5.1.1. Tipo de estudio

Utilizando un diseño de estudio transversal se evaluó un total de 356 perros de propiedad (animales con dueño) en el área urbana, periurbana y rural del municipio de La Mesa.

5.1.2. Selección de individuos

Criterios de inclusión: Caninos machos o hembras de cualquier raza y edad, del cual exista el consentimiento informado debidamente diligenciado y firmado por el propietario correspondiente, que residan en la zona rural y urbana del municipio de La Mesa – Cundinamarca.

Criterios de exclusión: Todo canino que no cuente con el debido consentimiento diligenciado y firmado por el propietario.

5.2. Área geográfica

El estudio se realizó durante tres años (2015 a 2017) en el municipio de La Mesa - Cundinamarca, Colombia (Figura 7). La zona presenta condiciones favorables para el ciclo de vida de los tripanosomas y triatominos que actúan como vectores, *R. colombiensis* y *P. geniculatus* son las principales especies de vectores en esta región.

El centro urbano de La Mesa está ubicado a 65 kilómetros de Bogotá a una altitud de 1.180 m.s.n.m, la temperatura promedio varía entre 18 - 24°C, con una precipitación media de 1337 mm³, en temporadas lluviosas de marzo a mayo y de octubre a noviembre

$$n = Z^2 * P * Q * N / e^2(N-1) + Z^2 * P * Q$$

n = Número de elementos de la muestra.

N = Número de elementos del universo.

P/Q = Probabilidad con la que se presenta el fenómeno.

Z² = Valor crítico correspondiente al nivel de confianza elegido.

E = Margen de error o de imprecisión permitido.

6. METODOLOGÍA PARA ALCANZAR LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

6.1. Metodología para alcanzar el objetivo específico 1: Detectar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en suero de caninos, mediante Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA) e Inmunofluorescencia Indirecta - (IFI)

Inicialmente se realizó una charla a cada propietario donde se explicó el motivo del estudio y los posibles factores de riesgo asociados a la infección por *Trypanosoma cruzi* de las mascotas. Una vez finalizada la inducción, se solicitó a los propietarios de mascotas que decidieron participar en el estudio, la autorización para la toma de muestra de su(s) mascota(s), mediante firma del consentimiento informado (ver Anexo 1).

Muestreo:

Por punción de la vena cefálica se tomó muestra de sangre total 5 ml (tubo tapa lila y tubo tapa roja) a cada canino, teniendo en cuenta las respectivas medidas de asepsia y bioseguridad. (Ver anexo 2).

6.1.1. Análisis serológico

Las muestras de suero se probaron para anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), usando las placas del kit ELISA Chagas III (Grupo Bios®) y anticuerpo secundario monoclonal anti-perro IgG-HRP de

cabra: sc-2433 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC), y un Kit de prueba de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (INS - COLOMBIA).

El punto de corte se determinó como la absorbancia óptica ≥ 1.16 (media ± 3 SD) para ELISA, y la dilución del suero de 1/32 para IFI. Los caninos se consideraron seropositivos cuando las pruebas ELISA e IFI fueron ambas positivas para anticuerpos (IgG) anti-*T. cruzi*.

6.1.2. Descripción procedimiento para ELISA

Para esta técnica inicialmente se requirió de la preparación de una solución de lavado a un volumen total de 50 ml, siguiendo las indicaciones del inserto del kit ELISA que ofrece una marca de pruebas diagnósticas registrada. Se agregó 200 ul de diluyente de muestra. Con el bosquejo listo de las muestras, se dispensaron 5ul de estas, incluyendo los respectivos controles. La placa se incubó durante 40 min a 37°C. Luego, se realizó el lavado con la solución de lavado diluida. El volumen de conjugado fue de 100 ul para cada pocillo, siendo este anticuerpo secundario monoclonal anti-perro IgG-HRP. Los periodos de incubación fueron de 30 min a 37°C. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento de lavado cuatro veces más. Con la placa completamente seca, se añadieron 100 ul de sustrato, incubado durante 20 min en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se adiciono 50 de solución de detención a cada pocillo. Con el lector para microplacas (Multiskan™ FC Microplate Photometer-Thermo Scientific™) se obtuvieron valores de absorbancia por método colorimétrico, los valores del “cut off” y los controles tanto positivos como negativos, indican el valor de referencia para la interpretación de los resultados, tomando positivos todos los valores que sean superiores al punto de corte.

6.1.3. Descripción procedimiento para IFI

En cada pozo de la lámina de IFI se dispensaron 15 ul de cada muestra (Suero) a una dilución 1:32 incluyendo la preparación de los controles positivos y negativos, este montaje se incubó a 37°C durante 40 min, luego se realizó un lavado de la lámina tres veces consecutivas con PBS-Tween 80 al 1%. Al concluir el último enjuague se hizo un lavado con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente, se adicionaron 15 ul de solución de Evans en cada pozo y se dejó 5 min a temperatura ambiente seguido de un enjuague con agua destilada, se adicionó una gota de glicerina tamponada y sobre ella una lámina cubre objetos, la conservación de las láminas se realizó en oscuridad para evitar la pérdida de fluorescencia.

La observación de las láminas se llevó a cabo en microscopio de fluorescencia (Microscope Zeiss Axio Scope A1) en objetivos 20X y 40X. La observación se inició con los controles y posteriormente con las muestras.

Interpretación de resultados para IFI

- Reactivo: Se evidencia mediante microscopio de fluorescencia una coloración fluorescente amarillo verdosa intensa en la totalidad del parásito, membrana celular, flagelo y citoplasma.
- No reactivo: se evidencia mediante microscopio de fluorescencia la superficie o bordes de los parásitos que muestran un color rojo o marrón oscuro.

6.2. Metodología para alcanzar el objetivo específico 2: Identificar los factores de riesgo asociados a los habitantes que se encuentran en contacto con los caninos infectados por *T. cruzi* del municipio de La Mesa - Cundinamarca.

Estudio ecológico

Siguiendo la metodología empleada en el Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas y la Cardiopatía Infantil, se realizó la caracterización de las viviendas mediante encuestas llenadas por observación de las casas y ambientes de la zona muestreada. Las condiciones ecológicas más representativas en la conformación de focos de transmisión se relacionaron con los factores ambientales que facilitan el establecimiento de poblaciones de triatominos como la presencia de palmas en unidades ecosistémicas de la zona de estudio.

Adicionalmente se tomaron datos relacionados a los factores de riesgo para los perros de la zona, de la encuesta de factores de riesgo del proyecto “DINÁMICA DE LA TRANSMISIÓN DE *Trypanosoma cruzi*, EN ZONAS URBANAS, PERIURBANAS Y RURALES EN LA REGIÓN ANDINA - MODELO MUNICIPIO DE LA MESA CUNDINAMARCA.” cuestionario que se aplicó transversalmente durante el tiempo de ejecución del proyecto, y el cual fue revisado por expertos en el tema y validado junto con las demás encuestas del macro proyecto. Los datos recolectados fueron:

- Zona de domicilio (urbana, periurbana y rural).
- Características de la vivienda (El techo es de fibras vegetales (paja o similares), las paredes son de fibras vegetales y/o tierra sin acabados, las paredes tienen grietas o hendiduras, el piso es de tierra, el piso tiene grietas o hendiduras, hay luz eléctrica, hay anjeos (mallas) en puertas y/o ventanas, hay materia fecal de pitos dentro o fuera de la vivienda).
- Presencia de animales domésticos (perros, gatos, loros, gallinas, etc.).
- Presencia de animales de monte cerca de la vivienda (ratas, borugos, chuchas, armadillos, etc.).

- Presencia de corrales, galpones u otras instalaciones con animales cerca de la vivienda.
- Presencia de enramadas o construcciones similares anexas a la vivienda, hay árboles (incluye palmas) cerca de la vivienda.
- Presencia de objetos acumulados dentro y fuera de la vivienda (cuadros, calendarios, afiches u otros objetos en las paredes).

Los datos obtenidos en el cuestionario anterior se cruzaron con los resultados de positividad obtenidos para perros e incluso de zangüeyas e insectos vectores (Estos dos últimos fueron datos del macroproyecto, no objeto de este estudio).

6.2.1. Análisis estadístico

Análisis univariado

A todas las variables se les realizó un análisis descriptivo que dependió de la naturaleza de las variables consideradas, así se determinó:

- Variables cualitativas: Se registraron las viviendas donde se observaron triatominos, ubicación de la vivienda al margen del río, envío de triatominos, aseo en la vivienda, el tipo de pared, tipo de techo, tipo de piso, anexos de la vivienda como: zarzos, gallineros, pesebreras y marraneras, presencia de caninos, presencia de aves, presencia de porcinos, presencia de bovinos, presencia de equinos, etc.
- Variables cuantitativas: Se tomaron datos de número total de personas por vivienda y tiempo de residencia en la vivienda.

A estas variables se les calcularon los estadísticos descriptivos.

Análisis bivariado.

Para determinar la asociación entre las variables estudiadas (edad, sexo y zona de residencia de los perros, características de la vivienda, presencia de vectores, presencia de animales domésticos diferentes del perro, presencia de animales peridomésticos – zangüeyas) y la presencia de anticuerpos específicos contra *T. cruzi*, se utilizó una prueba de Chi-cuadrado; también se estimó el odds ratio (OR) y el intervalo de confianza (IC) del 95%. Para esto, se utilizó el software libre R versión 3.4.3 – 2017. Se aceptó un nivel de significancia de $P < 0.05$. El área del municipio de La Mesa se dividió en tres zonas: urbana, periurbana y rural.

6.3. Metodología para alcanzar el objetivo específico 3: Probar una técnica de Western Blot in house, como posible método de diagnóstico confirmatorio de tripanosomiasis.

6.3.1. Obtención de antígenos o proteínas de excreción-secreción de tripomastigotes de *T. cruzi* a partir de cultivo

Para obtener los antígenos de excreción-secreción (amplia variedad de polipéptidos que los tripomastigotes de *T. cruzi* excretan y secretan al medio de cultivo celular) se realizaron cultivos de Tripanosomas a partir del ámpula rectal de vectores (triatominos), donde se encontraron formas metacíclica infectantes. Estos triatominos fueron capturados en el municipio por parte de los pobladores, con el fin de obtener antígenos o proteínas provenientes de cepas propias del municipio. El ámpula se agregó en un mililitro de PBS para realizar un montaje en fresco con lámina y laminilla con el fin de confirmar la presencia del parásito, posteriormente se añadió a tres mililitros de medio LIT (Infusión de Hígado Tryptose) con Gentamicina (100 ug/ml) y 5-fluorocitosina (500 ug/ml), suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, se incubó a 37°C durante cuatro días para obtener masificación, transcurrido el tiempo, se revisaron los cultivos haciendo montaje en fresco del medio de cultivo para observar la viabilidad de los parásitos, por medio de microscopio óptico.

Para recuperar los antígenos de excreción-secreción, se centrifugaron los cultivos de *T. cruzi* a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C, así se separó el sobrenadante que contenía los antígenos o proteínas productos de excreción-secreción y el sedimento con los parásitos, el sobrenadante se conservó a -20°C. La concentración de proteínas presentes en el sobrenadante fue determinada por el método colorimétrico de Bradford.

6.3.2. Técnica de Western Blot

Se desarrolló la técnica de acuerdo con lo descrito en la literatura, los reactivos para preparar los geles de poliacrilamida y el buffer carga de muestras se basó en el libro Gel Electrophoresis – Principles and Basics (63).

6.3.2.1. Preparación de los geles de poliacrilamida

Se realizaron geles a una concentración de 7%, usando las cantidades de reactivos que se muestran en la Tabla 2. El tiempo de polimerización usado para el gel de empaquetamiento y de resolución fue de 30 min.

Tabla 2. Proporciones de reactivos para preparar geles a una concentración del 7% SDS: Dodecil Sulfato de Sodio; TEMED: tetrametilendiamina.

Reactivo	de empaquetamiento 5%	el de resolución 7%
Acrilamida 30%	510 ul	2.310ul
1,5M tris,pH 8,8	---	2.500ul
0,5M tris,pH 6,8	750 ul	---
Agua destilada	1.639ul	1.985
SDS 10%	30ul	100ul
Persulfato de amonio 10%	60ul	100ul
TEMED	3ul	5ul
Vol. Final	3ml	7ml

Tratamiento de las muestras para la corrida electroforética: Los antígenos o proteínas de *T. cruzi* que se encontraron en el sobrenadante del cultivo, fueron tratados con buffer de carga de muestra (0,125M de Tris-HCl pH 6,8; 4% de dodecil sulfato de sodio (SDS); 20% de glicerol; 0,02% de azul de bromofenol y 0,2 M dithithreitol) y calentados a 100°C por 5 min, inmediatamente se puso la muestra a -20°C para generar un choque térmico.

6.3.2.2. Desarrollo de electroforesis:

La muestra tratada se sembró en cada uno de los pocillos (15ul). Los corridos fueron hechos en minigeles de poliacrilamida de 8,3 x 7,0 x 0,075 cm a una concentración del 7% en el gel resolución y 5% en el gel concentrador, utilizando 1ul de marcador de peso molecular (color prestained protein standard, broad range 11-245 kDa) en el Mini Proten tetra cell (Bio Rad) y corridos a 100 Voltios (V); 500 miliAmperios (mA); 250 Watts (W).

6.3.2.3. Electrotransferencia

Se realizó en membranas de nitrocelulosa (Hybond-C, Nitrocellulose Membrane 0,45 Micron, 82mm, 50/Pk) usando buffer de transferencia (25 mM de Tris-HCl; 20% de metanol v/v; 192 mM de glicina, agua ultra pura pH 8.3) usando la cámara de electrotransferencia Trans Blot Cell a 400mA por 2 horas según lo descrito en el protocolo de manejo de las membranas (66).

Después del proceso de electrotransferencia la membrana de nitrocelulosa se cortó en tiras de 3 mm de ancho, se dejó en solución de bloqueo al 10% (TBS Tris-Buffered Saline 30 ml y leche descremada 3gr) toda la noche, se lavó la membrana con TBS-T (Tris-Buffered Saline-Tween 20) y se colocó una tira a colorear con rojo de ponceau durante 10 min, luego se decoloró con ácido acético al 5% para observar si hubo transferencia de las proteínas, el resto de las tiras se conservaron en TBS 4°C hasta su uso.

6.3.2.4. Revelado

Cada uno de los sueros de los pacientes fue diluido 1/50 en solución de bloqueo al 10%, luego se incubaron en agitación constante a temperatura ambiente por dos horas. Después de ser lavadas tres veces por 10 min con TBS-T (Tris-buffer-salino-Tween 20) se colocaron en solución de conjugado enzimático (anti IgG perro marcada con peroxidasa) a una dilución de 1/5000 por dos horas, luego se hicieron tres lavados con TBS-T y un lavado final con TBS (Tris-buffer-salino) por 10min cada uno, finalmente el revelado de los antígenos se realizó con un sustrato (H₂ O₂ al 3% y diaminobenzidina a 0,5 mg/ ml) se dejó actuar en agitación suave hasta que se observaron bandas, luego se retiró esta sustancia y se lavaron las tiras con TBS por 10 min y se dejaron secar a temperatura ambiente toda la noche.

El resultado de la prueba de Western blot se informó como negativo cuando hubo ausencia total de bandas; como indeterminado en los casos de falsos positivos, y positivos cuando cumple los criterios de bandeo, de acuerdo con el que se haya adoptado (67).

Según la Guía de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas agosto 2010, las reacciones positivas se observan como bandas de precipitación en tiras de membranas sensibilizadas (68).

7. RESULTADOS

Las muestras analizadas en este estudio fueron tomadas de perros (*Canis lupus familiaris*) de las zonas: urbana, periurbana y rural del municipio de la Mesa Cundinamarca, sin especificación de raza, edad, sexo y bajo el consentimiento informado de sus dueños (Anexo 1). En total se obtuvo un acumulado de 356 muestras, de las cuales 163 fueron hembras y 193 machos. La edad promedio fue de 3.5 ± 2.9 años (Min: 0.25 Max: 15 años), de los cuales 193 (53.93%) fueron machos y 163 (45.78%) hembras. La zona con mayor cantidad de muestras tomadas fue en la urbana, donde predominaron las razas: Pastor alemán, French Poodle, Golden retriever, Pincher y Labrador; los animales de raza criolla predominaron en las zonas rurales (Tabla 3).

Tabla 3. Descripción sociodemográfica de la población canina muestreada en la Mesa/Cundinamarca

ZONA	TOTAL MUESTRAS	SEXO		EDAD		
		HEMBRA	MACHO	2 A 5 AÑOS	6-10 AÑOS	> 10 AÑOS
Rural	97	42	55	39	20	5
Urbana	206	95	111	64	22	8
Peri-urbana	53	26	27	13	2	1
Total	356	163	193	116	44	14

Todos los perros fueron evaluados clínicamente por el grupo de médicos veterinarios de la Universidad Antonio Nariño (Anexo 3) Según el criterio de los profesionales ninguno de los perros presentó signos clínicos compatibles con tripanosomiasis. Adicionalmente, los clínicos, evaluaron electrocardiográfica y eco-cardiográficamente a los perros positivos mayores de 5 años (Anexo 4) Ninguno de estos perros mostró cambios electrocardiográficos ni eco-cardiográficos compatibles con cardiopatía chagásica.

7.1. Objetivo específico 1: Detectar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en suero de caninos, mediante Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas (ELISA) e Inmunofluorescencia Indirecta - (IFI)

Las muestras de perros recolectadas en el municipio de La Mesa tuvieron una tasa de seroprevalencia general de 29.49% (IC 95% 24.71 - 34.18) (105/356) detectada mediante pruebas ELISA / IFAT, tomando como referencia el algoritmo diagnóstico para humanos, establecido por el INS (70). Del total de caninos seropositivos, 62 fueron machos y 43 hembras, demostrando que la tasa de seropositividad para *T. cruzi* de acuerdo con el sexo es de 32.12% y 26.38% respectivamente. Así mismo se encontró que el 28.02% de caninos pertenecen a edades menores a dos años y 31.04% están en rangos de edad mayor o igual a dos años, mostrando una seropositividad para *T. cruzi* mayor en caninos en rangos de edad mayor o igual a dos años. La tabla 4 muestra el consolidado de resultados.

Tabla 4. Distribución de la población canina seropositiva

FACTOR DE RIESGO		N	POSITIVOS	FRECUENCIA (%)	OR	C.I. 95 %	P
Sexo	Machos	193	62	32.12	1.32	0.83 - 2.09	0.24
	Hembras	163	43	26.38	Ref.		
Edad	< 2	182	51	28.02	0.87	0.55 - 1.36	0.53
	≥ 2	174	54	31.04	Ref.		
Zona de Domicilio	Urbana	206	46	22.33	0.80	0.40 - 1.60	0.53
	Rural	97	47	48.45	2.62	1.26 – 5.43	0.009*
	Periurbana	53	12	22.64	Ref.		
Total		356	105	29.49			

7.2. Objetivo específico 2: Identificar los factores de riesgo asociados a los habitantes que se encuentran en contacto con los caninos infectados por *T. cruzi* del municipio de La Mesa - Cundinamarca.

7.2.1. Factores de riesgo evidenciados a través de fotografías

El ecobioma de La Mesa Cundinamarca, es propicio para el desarrollo de triatomíneos (vectores de *T. cruzi*) y especies mamíferas silvestres (reservorios de *Trypanosoma cruzi*). A manera general cuenta con amplia vegetación típica de bosque montano bajo tropical. Dentro de este ecobioma, los animales silvestres, más frecuentemente son: Zarigüeyas, Roedores (*Ratus ratus*), Armadillos y Borugos, los cuales deambulan ampliamente entre las zonas rurales y periurbanas y en algunos sectores urbanos (botaderos de desechos orgánicos producto de los mercados), debido a que no existen demarcaciones pronunciadas (en distancia) entre las zonas urbana, periurbana y rural en el Municipio; esto permite un estrecho y permanente contacto con los animales silvestres, domésticos y peridoméstico (Bovinos, equinos, ovejas, cerdos, cabras, entre otros) que evidentemente es un factor de riesgo para la infección con *T. cruzi* de los animales domésticos y algunos peridoméstico (Figura 8).



Figura 8. Panorama de área periurbana del municipio la Mesa Cundinamarca.

El área periurbana del municipio de la Mesa muestra gran cantidad de zonas boscosas distribuidas a lo largo del perímetro del casco urbano como se evidencia en la vista aérea del Municipio. La presencia de árboles, palmas de corozo y arbustos que rodean las viviendas en estas zonas son un factor que facilita el sinantropismo de los insectos vectores (Figura 8).

La zona rural (Se define zona rural como aquella en la cual predominan las actividades asociadas a la vocación agropecuaria o forestal del suelo.) muestra mezclas de zonas boscosas y zonas de explotación agrícola y/o pecuaria, en la que predominan árboles, palmas y arbustos, cultivos y ganadería. La zona rural en el municipio de La Mesa es particularmente atípica, pues allí se encuentran viviendas modernas (condominios recreacionales y mansiones de campo modernas), así como, casas hechas de bahareque y madera entramada. (Figura 9).



Figura 9. Tipos de vivienda encontrados en la zona rural del municipio de La Mesa, Cundinamarca

La zona urbana se caracterizó por ser un área poblada con menor predominio de zonas boscosas y más viviendas verticales y colectivas. Las construcciones más recientes fueron de concreto reforzado y techo de asbesto cementado, aunque también se observaron casas de construcción antigua de techos de bahareque y madera

entramada. Se evidencio alta población vegetal alrededor de las casas, así como de animales domésticos (perros, gatos y gallinas) (Figura 10).



Figura 10. Entornos urbanos relacionados con la presencia de triatomino y zangüella - Vivienda del área urbana del municipio la Mesa Cundinamarca

Durante la jornada de toma de muestra se evidenció la presencia de animales libres en zonas boscosas del área rural, urbana y periurbana, lo que crea el riesgo de contacto con los vectores y con otros animales silvestres, incidiendo de esta forma en la propagación de la enfermedad (figura 11).



Figura 11. Sector periurbano del municipio la Mesa Cundinamarca.

La encuesta, permitió determinar factores de riesgo asociados a la infección de perros con *T. cruzi* en el municipio de La Mesa; los factores de riesgo encontrados de mayor relevancia fueron:

- Los techos de casa hechos de fibras vegetales (paja o similares), las paredes son de guadua entramada y pañetadas de tierra vistas en algunas veredas, siguen siendo los factores de mayor riesgo. Así mismo, paredes con grietas o hendiduras, pisos en de tierra, y por supuesto el uso de alumbrado eléctrico, condición de la que hoy en día gozan un alto porcentaje las viviendas veredales del país.
- La falta de mosquiteros y anjeos (mallas) en puertas y ventana, fue otro hallazgo relacionado con el riesgo de infección al parásito.
- En algunas viviendas rurales y periurbanas, se observó presencia de materia fecal de triatomíneos, dentro o fuera de las viviendas, hecho asociado también con la presencia de palmas y troncos huecos en perímetros entre los 100 y 300 metros alrededor de las viviendas. Todo esto indica la presencia de vectores peridomiciliados (Figuras 8, 9 y 10).

- Presencia de animales domésticos (perros, gatos, loros, gallinas, etc.) y peridomésticos (vacas, asnos, cerdos, cabras y ovejas) en zonas rurales y periurbanas. Adicionalmente, en algunas zonas periurbanas también fueron hallados animales peridomésticos. Este tipo de hallazgos se relaciona con fuentes amplias de alimentación de los insectos vectores de *T. cruzi*.
- Presencia de mamíferos silvestres (ratas, borugos, chuchas, armadillos, etc.) cerca de las viviendas rurales y periurbanas son uno de los más importantes factores de riesgo asociados con la dinámica de transmisión de tripanosomas entre los ciclos silvestre, peridoméstico y urbano, que termina con la infección de humanos (Figura 12)
- Presencia de corrales, galpones, acopios de madera, acopios de materiales de construcción, enramadas cercanas a las viviendas, fueron hallazgos transversales en todo el municipio no hubo diferencia incluso en algunos lugares del casco urbano.



Figura 12. Zarigüeyas capturadas en zonas periurbanas del municipio de La Mesa.

El riesgo de infección en la población canina con *T. cruzi* es frecuente y alto, debido al contacto directo con los vectores, zarigüeyas y otros mamíferos silvestres, debido a que estos animales prácticamente son sinantrópicos en este territorio. (Figura 13).

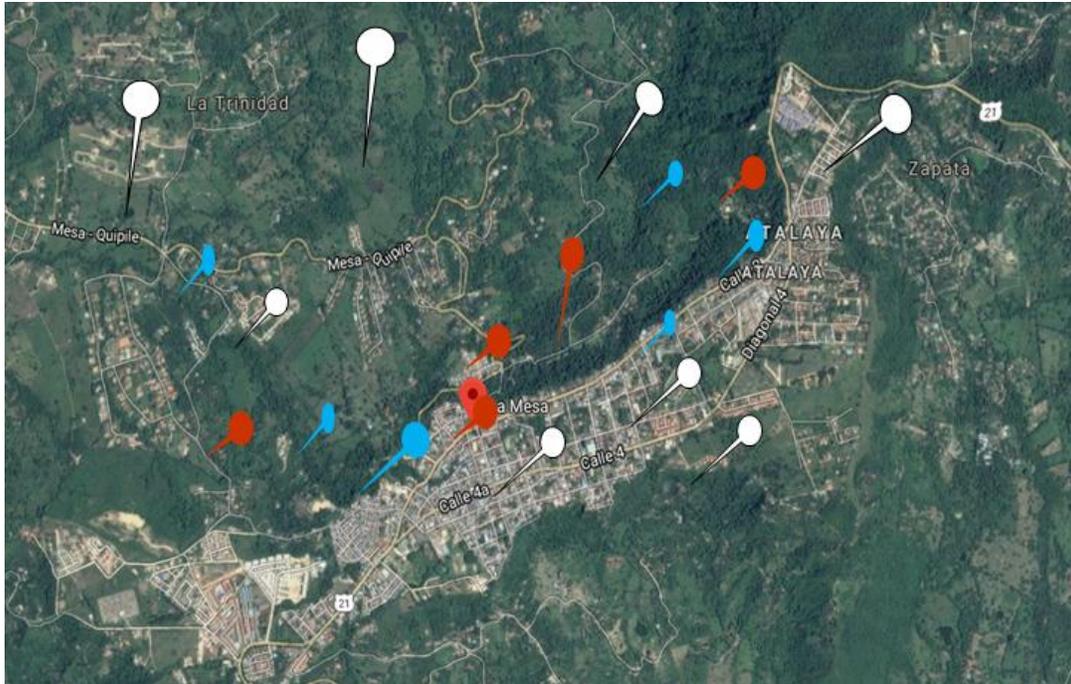


Figura 13. Mapa de la Mesa Cundinamarca. Se demarcan algunas zonas de área Urbana (Rojo), Periurbana (Azúl) y Rural (Blanco)

Los resultados mostraron que existe una alta seropositividad en perros de las zonas rurales (48.45%), comparados con los de las zonas urbanas (22.33%) y periurbanas (22.64%). Por otro lado, llamó la atención la presencia de triatominos y zangüeyas positivas en las zonas periurbanas, respecto de las zonas urbanas y rurales. Sin embargo, cabe resaltar que los muestreos fueron aleatorios y no hubo uniformidad en el tamaño de las muestras analizadas en ninguna de las tres zonas, estos hallazgos simplemente muestran el alto riesgo de infección no solo de animales domésticos (perro y gato), sino el permanente riesgo de infección humana con *T. cruzi*. (Tabla 5) (Figura 14).

Tabla 5. Asociación de zona (Urbana, Periurbana y Rural) frente a perros, zarigüeyas y vectores positivos en la Mesa Cundinamarca

LOCALIDAD	PERROS (<i>Canis lupus familiaris</i>)		ZARIGÜEYAS (<i>Didelphis marsupialis</i>)		VECTORES			
	n	Positivos (%)	n	Positivas (%)	R. colombiensis		P. geniculatus	
					n	Positivos (%)	n	Positivos (%)
Urbana	206	46 (22.33)	10	2 (20.0)	6	2 (33.33)	15	6 (40.0)
Periurbana	53	12 (22.64)	4	4 (100)	6	5 (83.33)	6	2 (33.33)
Rural	97	47 (48.45)	13	3 (23.07)	20	3 (15.0)	16	3 (18.75)
TOTAL	356	105 (29.49)	27	9 (33.33)	32	10 (31.25)	38	11 (28.94)

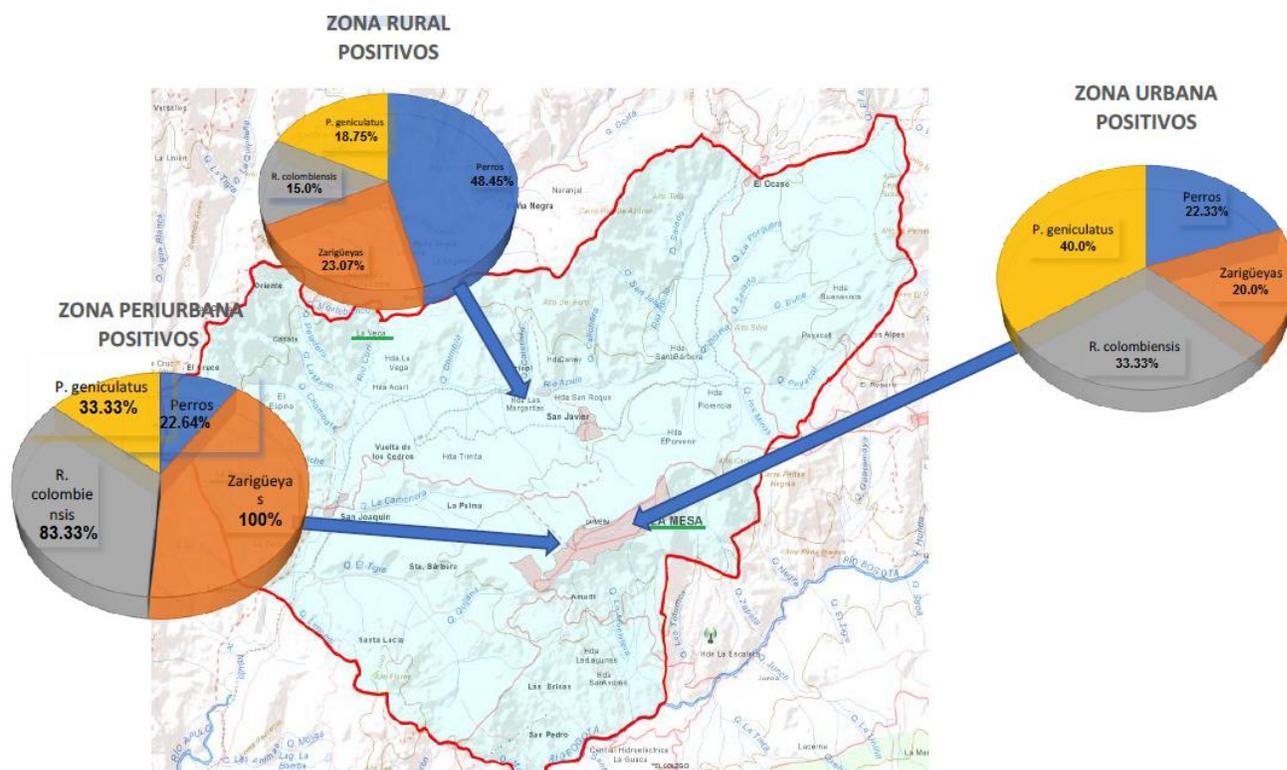


Figura 14. Porcentaje de distribución por zona de especies animales positivas a T. cruzi

7.3. Objetivo específico 3: Probar una técnica de Western Blot in house, como posible método de diagnóstico confirmatorio de tripanosomiasis

Adicionalmente se intentó probar una técnica de western blot In-house, usando antígeno (proteínas TESA- proteínas solubles de tripomastigotes en cultivo) aislado del municipio de La Mesa, con el objeto de usarla como otro método de diagnóstico confirmatorio de tripanosomiasis adicional a los ya vigentes de ELISA e IFI.

Se inició con la preparación de electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) para evidenciar el patrón electroforético de las proteínas TESA, aisladas a partir de cultivo de tripanosomas aislados de triatomíneos en el municipio de La Mesa. En las electroforesis se observó claramente el patrón de bandeo TESA. La mejor resolución se encontró a concertaciones del 7% de SDS-PAGE y 10% de SDS.

Tratamientos de la muestra

Para evaluar la calidad de la muestra de sobrenadante donde están contenidas las proteínas de *T. cruzi*, se montaron diferentes ensayos, usando sobrenadantes de cultivo concentrados con polietilenglicol 8000 (PEG-8000) al 13%, y sin concentrar. Adicionalmente, se probó denaturar la muestra con 2B-mercaptoetanol. Se obtuvo un patrón de bandeo evidente en todos los carriles, sin embargo, los mejores patrones se obtuvieron en los carriles 6 y 7, y correspondieron a muestras no concentradas y denaturadas. Los carriles 2, 4 y 5 muestran demasiado ruido de fondo, debido a la alta concentración de albúmina contenida en los medios de cultivo. (Figura 15).

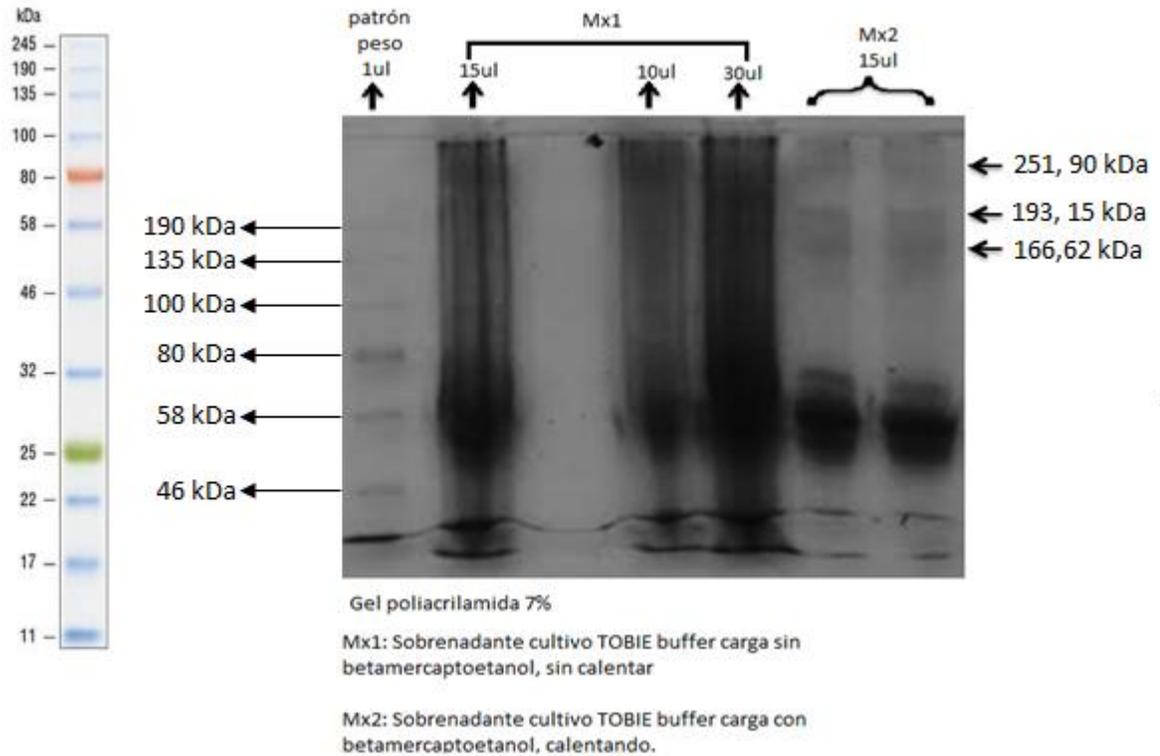


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%, tratamiento de muestra con betamerceptoetanol. Se observan bandas claras en la parte superior derecha del gel que pertenecen a la muestra de sobrenadante proveniente de cultivo con medio TOBIE.

Tinción de los geles SDS-PAGE

Se realizaron tres montajes de coloraciones diferentes para los geles de poliacrilamida: Azul de Coomassie coloidal, Azul de Coomassie no coloidal y tinción de plata, con el fin de evidenciar con cuál de ellos se observaba mejor las bandas de proteínas separadas por peso molecular y con menor interferencia en el fondo del gel. Se encontró un mejor revelado en el gel con la coloración Azul de Coomassie no coloidal.

Inmunotransferencia:

Para la estandarización de la transferencia de proteínas electroforesis a la membrana de nitrocelulosa, se probaron dos técnicas, una de ellas fue la transferencia por peso, la cual consistía en una matriz de toallas absorbentes y buffer de transferencia

con ayuda de un peso de aproximadamente 2 kilos, el montaje se dejó toda la noche y las proteínas se transferían a la membrana por capilaridad. La otra fue la electrotransferencia con buffer y cámara diseñada para transferencia de proteínas con voltaje, usando el protocolo de manejo de membranas de la casa comercial de donde se adquirieron las membranas. Se evidenció después de este ensayo que hubo más transferencia usando la cámara de electrotransferencia.

Revelado

Para la técnica de revelado se desarrolló un dot blot con el fin de estandarizar las cantidades a usar de muestra, conjugado y DAB (diaminobenzidina). Teniendo en cuenta que esta técnica ofrece importantes ahorros en tiempo, en un dot blot las biomoléculas a detectar no son separadas por cromatografía y sólo se requiere una gota que contenga la molécula para ser detectada, dot blot confirma la presencia o ausencia de una biomolécula. Se usaron muestras de perro positivas para toxoplasma y leishmania, de forma que se logró tener controles negativos para Chagas.

7.3.1. Estandarización técnica Dot Blot

La técnica se desarrolló de la siguiente manera:

1. A membranas de nitrocelulosa 1cm x 1cm, se le adicionó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente por 5 min.
3. Se procedió a bloquear las membranas con la solución de bloqueo al 10% toda la noche.
4. Se realizó las diluciones del anticuerpo primario y se incubó durante 2 horas en agitación.
5. Se realizó 3 lavados con TBS-T (Tris-Buffered Saline-Tween 20),
6. Se agregó el conjugado (anti-IgG Dog marcada con peroxidasa – BIORAD y/o anti-IgG humana marcada con peroxidasa – BIORAD cuando fuera el caso) y se dejó incubando por 2 horas.

7. Se realizó 3 lavados con TBS-T y un lavado final con TBS (Tris-Buffered Saline).
8. El revelado de los antígenos se realizó con un sustrato (H₂O₂ al 3% y la diaminobenzidina a 0,5 mg/ mL) se puso en agitación suave hasta observar la coloración café oscura en la membrana.
9. Se realizó un lavado con TBS y se dejaron secando a temperatura ambiente las membranas de nitrocelulosa.

La estandarización de dot blot, consistió en variar las diferentes concentraciones de antígeno en la membrana, dilución del anticuerpo primario (suero del paciente), dilución de anticuerpo secundario (conjugado), concentración de DAB para el revelado, finalmente se realizó un ensayo concentrando las proteínas del sobrenadante provenientes de cultivo por medio de filtración por jeringa (10 veces) y un ensayo solo colocando el antígeno sobre la membrana y dejando secar a temperatura ambiente, en donde se evidencian mejores resultado en las membranas que se concentraron las proteínas por medio de filtración (Figura 16).



Figura 16. Ensayo con membranas de nitrocelulosa, Usando concentración de antígeno 40 ug/ml, dilución de anticuerpo primario 1:50, dilución de 1:5000 para el anticuerpo conjugado y sustrato H₂O₂ al 3% con diaminobenzidina a 0,5 mg/ mL

Resultados W.B.

Después de la Inmunotransferencia y revelado del montaje W.B., no se obtuvieron resultados adecuados debido a que no había suficiente concentración de proteínas TESA. (Figura 17).

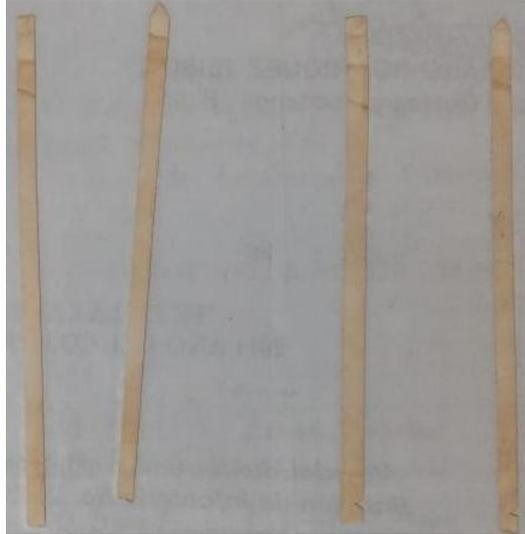


Figura 17. Tiras de membrana de nitrocelulosa después de transferencia.

8. DISCUSIÓN

Entre los animales domésticos, el perro es un huésped importante en el ciclo de vida del parásito *T. cruzi*, pues mantiene contacto cercano con el hombre generando un factor de riesgo constante. Estos caninos al ser carnívoros se pueden infectar con la ingestión de tejido contaminado (1) de otros mamíferos que poseen la enfermedad, además el hecho de estar la mayor parte de su vida en el exterior en compañía de otros mamíferos infectados aumenta la posibilidad de contraer la enfermedad y de esta manera mantener activo el ciclo de vida de *T. cruzi*.

Debido a la intervención del hombre en zonas selváticas, la aparición de la enfermedad de Chagas se ve favorecida, principalmente porque el contacto de humanos y animales domésticos con focos naturales generan desequilibrios que fuerza a los triatomino a generar procesos de adaptación a las viviendas humanas (Domiciliación), y por ende cambiar también su dieta alimentaria, convirtiéndose de esta manera a antropofílico y zoofílico (2). Un estudio realizado por Calderón O. y col., muestra que las preferencias alimenticias de algunas especies de triatominos fueron del 40% con la mezcla de sangre humana y sangre de perro, lo que demuestra la preferencia por parte del vector a estas dos especies (3).

Los perros están presentes en las familias como compañía en los hogares y desempeñan un papel importante en la epidemiología de la enfermedad ya que permanecen en contacto con la vida silvestre y al mismo tiempo con la población humana, se han categorizado presentando altas parasitemias y portadores asintomáticos (50). En este estudio se evidenció un factor de riesgo de contaminación de los animales domésticos, donde al tener la facilidad de moverse a diferentes zonas y el hecho de jugar/atrapar/comer insectos y zarigüeyas, corren el riesgo de adquirir el parásito de zonas silvestres y por ende mantenerlo en zonas rurales, urbanas y periurbanas.

Es así como los hallazgos obtenidos en este estudio permiten evidenciar que, en el municipio de la Mesa, los perros son reservorios que hacen parte del ciclo activo del parásito y su estadio tanto domiciliario como peridomiciliario en las zonas estudiadas, forman

posibles focos de riesgo para el desarrollo de infección en humanos, sin embargo, es importante mencionar que, al ser el primer contacto del pito, pueden ser bloqueadores de transmisión, datos reportados (8). En este estudio se obtuvo una prevalencia alta (29.49%) en perros del municipio de La Mesa Cundinamarca, en comparación a lo reportado en Sucre, Venezuela por Berrizbeitia M. y *Col 2013* donde mencionan que obtuvieron una seroprevalencia de infección para *T. cruzi* en perros de 22,1 % (8) y la investigación de Vásquez C. y col. donde encontraron una prevalencia del 15,1% (14).

Resaltando la importancia del estudio realizado en Momposina, donde evaluaron escenarios propicios para el desarrollo de la enfermedad de Chagas, se puede decir que la Mesa forma parte de los nuevos escenarios epidemiológicos donde existe la enfermedad de Chagas, que a pesar de los pocos estudios que se han realizado en esta región se evidencia la alerta para que se actúe a nivel sanitario para el control y seguimiento en el área respecto a la enfermedad de Chagas (8,16).

El alto porcentaje de los caninos hallado en este estudio los convierte en reservorios domésticos de la infección, y por ende al encontrarse en constante contacto con la población humana los transforma en factores de relevancia en la transmisión de la enfermedad (14), pues son reservorios constantes no sólo dentro de las viviendas sino en el exterior de ellas.

Los resultados obtenidos de la tasa de seropositividad para *T. cruzi* de acuerdo con el sexo fue de 32.12% (machos) y 26.38% (hembras), corroborando la evidencia de una mayor positividad en mamíferos machos, así como lo menciona Manrique D. y *col 2012* donde afirma que la prevalencia en machos puede ser posible debido a la mayor movilidad que poseen los machos, debido a la búsqueda de alimento en zonas boscosas (caza) o con fines reproductivos, que lo llevan a moverse exponiéndose al contacto con triatominos peridomiciliarios (81)

En cuanto a edad se encontró que el 31.04% están en rangos de edad mayor o igual a dos años, mostrando una seropositividad para *T. cruzi* mayor en caninos en

rangos de edad mayor o igual a dos años, lo cual corresponde según los estudios realizados por Berrizbeitia M. y Col/2013 En Sucre Venezuela y Galaviz L. y Col/2017 En Nuevo León, México, los cuales mencionan que los perros con edades juveniles son más afectados debido a la mayor movilidad y juego que estos poseen, y por tal motivo son catalogados como centinelas de la enfermedad ya que indican infecciones recientes por el parásito (8, 81)

Teniendo en cuenta los resultados de seropositividad más altos encontrados en edades jóvenes y zonas de domicilio de área rural, se correlaciona con el factor de riesgo de contacto con animales silvestres y vectores, además del hábito de libertad que los caninos poseen, sus propietarios no los encadenan ni limitan su movilidad, por este motivo permanecen en zonas (81) Se hace por tanto necesario implementar medidas de control en las mascotas, como frenar el contacto constante y mantener jornadas de fumigación del lugar donde habita el canino con el fin de eliminar el vector.

Es importante recalcar la incidencia de la presencia de material vegetal y escombros presentes alrededor de la vivienda, como factores de riesgo, ya que estos son materiales que facilitan la estadía y reproducción del vector en zonas peridomiciliarias facilitando la propagación de la enfermedad tanto en humanos como en caninos, es necesario implementar medidas de prevención de la comunidad (13).

Debido a que ningún test está considerado el “Gold standard” para confirmar el diagnóstico de Infección por este parásito (71), y que las técnicas serológicas usadas ELISA e IFI para la detección de anticuerpos resultan ser de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades crónicas, se intentó estandarizar un western blot, que actuaría como una técnica confirmatoria ya que, al usar antígenos propios de la zona, favorecería al diagnóstico eficaz (81). No se alcanzó la estandarización de la técnica porque no se logró una buena masificación de *T. cruzi* y por lo tanto la cantidad de proteínas fue baja y no se logró un revelado óptimo (13).

9. CONCLUSIONES

1. Los datos muestran una situación relevante para la población canina del municipio de La Mesa, Cundinamarca, dado que no existían datos previos en cuanto a situación de la infección de *T. cruzi* en la zona.
2. Se encontró una alta prevalencia de perros con anticuerpos IgG *anti-T. cruzi* (29.49%) en el municipio de la Mesa Cundinamarca.
3. La alta prevalencia hallada en el presente estudio demuestra ciclos de transmisión activos para *T. cruzi* en el Municipio de La Mesa, Cundinamarca.
4. Los perros podrían estar señalando un posible papel de barrera biológica de protección para los seres humanos, debido a que estos son una fuente de alimento más fácilmente disponible para los triatóminos vectores.
5. El hallazgo de especies de triatomínicos intrusivas y de mamíferos positivos (zarigüeyas – *Didelphis marsupialis*) para *T. cruzi* en el domicilio y el peridomicilio, así como en los enclaves urbanos, periurbanos y rurales, demuestra el riesgo de infección en las poblaciones caninas que habitan en viviendas urbanas, periurbanas y rurales adyacentes a los ecótopos donde se mantiene el ciclo silvestre.
6. Los factores de riesgo conocidos para la infección por *T. cruzi* (ambiente físico, ambiente natural, vectores y reservorios) se encuentran presentes en el municipio.
7. El estudio permitió establecer que el municipio de La Mesa, Cundinamarca, constituye una zona endémica para la infección por *Trypanosoma cruzi*.
8. Se adelanto de manera importante el desarrollo de una técnica de Western Blot in-house en aras de favorecer el diagnostico confirmatorio de tripanosomiasis americana, resaltando el hecho de que trabajaron con antígenos que provenían de parásitos obtenidos directamente del municipio de la Mesa Cundinamarca.
9. Es importante resaltar la importancia de obtener una alta concentración de proteínas al momento de realizar la técnica del western blot, pues mediante el

proceso de Dot blot se pudo evidenciar que el concentrar las proteínas mejora en gran medida la observación del resultado.

10. En estudios anteriores se reporta la técnica del western blot para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas con una sensibilidad del 86.6%, 100%, 99%, y una especificidad del 100%, lo que demuestra la efectividad de la técnica como posible método “Gold Estándar” en el diagnóstico definitivo de la enfermedad.
11. En cuanto a las técnicas serológicas ELISA e IFI, se destacan por el hecho de ser pruebas económicas y fáciles de usar, pero así mismo poseen una desventaja: en pacientes cuyo sistema de defensa está alterado por algún motivo como lo son enfermedades autoinmunes o tratamientos inmunodepresores, presentan una alta probabilidad de reacciones cruzadas.
12. En cuanto a la IFI su uso se ha restringido a laboratorios debidamente equipados con microscopios de fluorescencia, requiriéndose para su ejecución la presencia de técnicos capacitados, ya que la interpretación de los resultados por personal inexperto puede llegar a ser cuestionable.

10. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda intensificar los programas de educación y vigilancia epidemiológica en el Municipio de La Mesa, Cundinamarca.
2. Se recomienda desarrollar estudios similares en distintas zonas de la Región Andina con características biogeográficas similares a las del Municipio, que permitan validar el presente modelo.
3. Se recomienda realizar estudios epidemiológicos que permitan establecer el papel de los perros y otros animales domésticos en el ciclo de transmisión del parásito.
4. Adicionalmente, es necesario buscar estrategias de control de los vectores con herramientas amigables con el medio ambiente y la salud humana.
5. Se recomienda implementar un sistema de cultivo a escala que permita obtener alta concentración de proteínas TESA para el desarrollo de técnicas diagnósticas a partir de inmunoblot.
6. Se recomienda validar la técnica de W.B. adelantada durante la ejecución de este estudio.

12. ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento informado para animales.

CERTIFICADO DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO (ANIMALES)



DATOS DEL PROPIETARIO:

Nombre: _____

Tipo de identificación: _____ N° de identificación: _____

Edad: _____ Sexo: _____ N° de celular/teléfono: _____

Municipio: _____ Vereda: _____

DATOS DE LA MASCOTA:

Nombre de la(s) Mascota(s): _____

Edad: _____ Sexo: _____

Soy el dueño del / los animal (es) arriba descrito (s), y estoy autorizado para llenar este consentimiento. He leído, me han leído o me han explicado la información sobre el propósito del estudio "DINAMICA DE LA TRANSMISIÓN DE *Trypanosoma cruzi*, EN ZONAS URBANAS, PERI-URBANAS Y RURALES EN LA REGION ANDINA - MODELO MUNICIPIO DE LA MESA CUNDINAMARCA", los riesgos y beneficios para mi mascota. He tenido la oportunidad de hacer preguntas sobre lo que no comprendí y me siento satisfecho (a) con las respuestas.

Acepto voluntariamente que mi mascota participe en este estudio y a que se le realice examen clínico general y punción venosa para la extracción de una muestra sanguínea.

Firma del Participante

Si no sabe escribir:

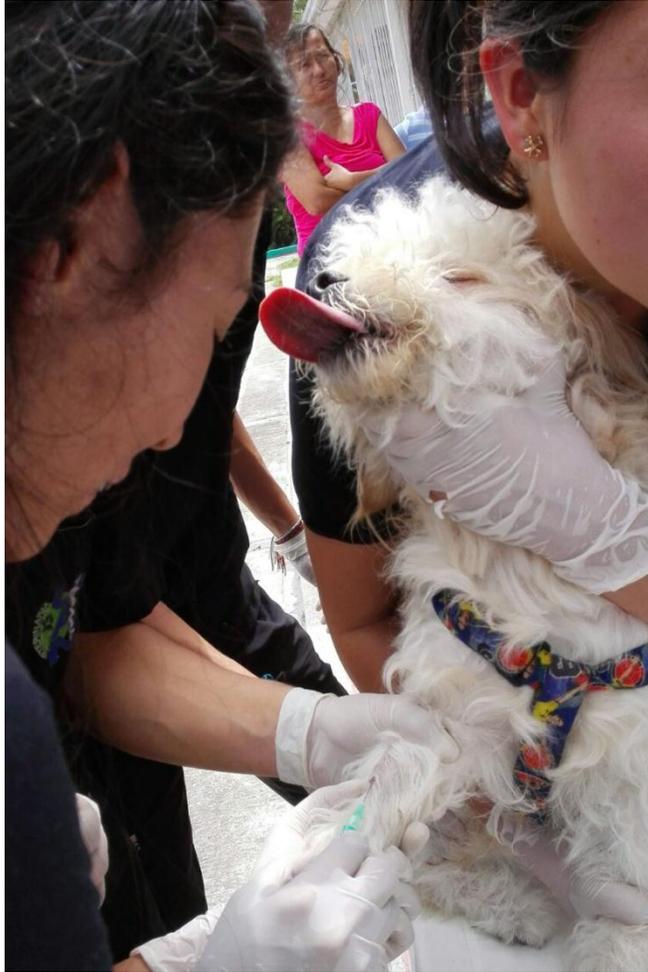
Nombre del Testigo Firma del Testigo: _____
(Seleccionado por el participante y sin nexos con el grupo de investigación).

Nombre del Encuestador

Firma del Encuestador

Fecha ____/____/____ (dd/mm/aa)

ANEXO 2. Toma de muestra



ANEXO 3. Valoración clínica de los caninos



ANEXO 4. Evaluación de los caninos positivos mayores de 5 años a través de Ecocardiografía



13. REFERENCIAS

1. Buendia JA. Calidad de la evidencia científica: un reflejo del estado actual de la enfermedad del chagas. NOVA. 2006; 4(5).
2. Instituto Nacional de Salud. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Guía Protocolo para la vigilancia en salud pública de Chagas. [Online].; 2010 [cited 2017 marzo 20. Available from: [HYPERLINK "https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/PROTOCOLO%20CHAGAS%20mayo%20de%202010.pdf"](https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/PROTOCOLO%20CHAGAS%20mayo%20de%202010.pdf)
3. Ministerio de Salud y Protección Social - Federación Médica Colombiana.. Enfermedad de Chagas-memorias. [Online].; 2012-2013 [cited 2017 Marzo 3. Available from: [HYPERLINK "https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/Memorias_chagas.pdf"](https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/TH/Memorias_chagas.pdf)
4. Herrera L. Una revisión sobre reservorios de Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. Bol Mal Salud Amb. 2010; 50(1).
5. Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. Biomedica. 2007; 27(1).
6. Turriago BC, Vallejo GA, Guhl F. seroprevalencia de Trypanosoma cruzi en perros de dos áreas endémicas de Colombia. rev.fac.med. 2008; 16(1).
7. Reyes L, Silesky E, Cerdas C, Chinchilla M, Guerrero O. Presencia de anticuerpos contra Trypanosoma cruzi en perros de Costa Rica. Parasitol. Latinoam. 2002 Enero; 57(1-2).
8. Bonfante R, Rodríguez C, Oviol B, García D, Mogollón A, Aldana E, y col. Seroprevalencia de la infección por Trypanosoma cruzi y factores asociados en un área endémica de Venezuela. Cad. Saúde Pública. 2011 ; 27(10): p. 1917-1929.
9. Berrizbeitia M, Concepcion JL, Carzola V, Rodríguez J, Cáceres A, Quiñones W. Seroprevalencia de la infección por Trypanosoma cruzi en perros en el estado de Sucre, Venezuela. Rev INS Biomédica. 2013; 33(2).
10. Vigilancia de la infección de Trypanosoma cruzi en perros y gatos en una zona rural del noroeste de Argentina. Rev Pan Salud Publica. 2006; 20(5).

11. González S, Ramírez N, Sandoval AH, Vásquez JC, Monroy HG, Barbosa A. Trypanosoma cruzi in dogs: electrocardiographic and echocardiographic evaluation, in Malinalco, State of Mexico. Research and Reports in Tropical Medicine. 2011; 2(18): p. 155 – 161.
12. Padilla RJ. Situación de la enfermedad de Chagas en Colombia Primer taller internacional sobre control de la enfermedad de Chagas. VI reunion de la iniciativa andina para el control de la enfermedad de chagas. uniandes. 2005;: p. 19-25.
13. Manrique D, Manrique F, Lorca F, Ospina J. Prevalencia de anticuerpos para Trypanosoma cruzi en caninos de dos municipios endémicos de Boyacá. Rev.MVZ Córdoba. 2012; 17(1): p. 2916-2923.
14. Vasquez C, Robledo S, Calle J, Triana O. Identificación de nuevos escenarios epidemiológicos para la enfermedad de Chagas en la región Momposina, norte de Colombia. Rev. Biomedica. 2013; 33(4).
15. Portugal C, García Z, Monteón V, Chávez V, Portugal M, Ramos C. Anticuerpos contra Trypanosoma cruzi en humanos y perros y presencia del parásito en Meccus pallidipennis en la localidad de Puente Pantitlán, Morelos, México.. Rev. Biomed. 2011; 22(3).
16. Sanmartino M, Crocco L. Conocimientos sobre la enfermedad de Chagas y factores de riesgo en comunidades epidemiológicamente diferentes de Argentina.. Rev. Panam Salud Publica. 2000; 7(3).
17. SIVIGILA. reporte dew la enfermedad de chagas. 2016 diciembre.
18. Rojas M, Várquez P, Villarreal M, Velandia C, Vergara L, Morán Y, y col. Estudio seroepidemiológico y entomológico sobre la enfermedad de Chagas en un área infestada por Triatoma maculata (Erichson 1848) en el centro-occidente de Venezuela. Rev. scielo. 2008; 24(10).
19. Larrondo G.. Santiago C2. Presencia de trypanosoma cruzi en caninos de la comuna de til-til, región metropolitana.. Universidad de Chile, facultad de ciencias veterinarias y pecuarias. Departamento de Ciencias Biológicas Animales. 2017.
20. Ruiz J. Historia de la Enfermedad de Chagas. Gac Med Bol. 2007; 30(2).
21. Lewinsohn R. Carlos Chagas and the discovery of Chagas' disease (American trypanosomiasis). J R Soc Med. 1981 ; 74(6): p. 451–455.

22. Zabala JP. Historia de la enfermedad de Chagas en Argentina: evolución conceptual, institucional y política. *Hist. cienc. saude-Manguinhos*. 2009; 16(1): p. 57-74.
23. Menghi CI. Salvador Mazza: un rebelde con causa. *Rev. argent. microbiol.* 2012; 44(1).
24. Chuit R, Segura EL. El control de la Enfermedad de Chagas en Argentina. Sus resultados. *Rev Fed Arg Cardiol.* 2012; 41(3): p. 151-155.
25. Santos C, Santos JE, Cardoso FA, Furtado E, Pinto JC. Current situation and perspectives regarding human Chagas disease in midwestern of the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2014; 109(3).
26. Serpa F. Historia de la Tripanosomiasis Americana en Colombia. *MEDICINA.* 2000; 22(2).
27. Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Enfermedad de Chagas. Primera Edición ed. Rosas F, Vanegas D, Cabrales M, editors. Bogotá D.C; 2007.
28. Pinto JC, Rodrigues J. Emmanuel Dias and Trypanosoma cruzi discovery: two centenaries to celebrate-Editorial. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(5).
29. Guhl F. Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Rev Biomed.* 2009; 20(3): p. 228-234.
30. Guhl F. Programas en la eliminación de la transmisión de la enfermedad de Chagas en Colombia. *Rev Medica.* 2000 Agosto; 22(2).
31. Frasch AC, Hoeijmakers JH, Fase-Fowler F, Borst P, Brunel F, Davison J. Maxi-circles and mini-circles in kinetoplast DNA from Trypanosoma cruzi. *Elsevier.* 1980; 607(2): p. 221-231.
32. Escandón-Vargas KMZC, Salazar L. Blood-feeding of Rhodnius prolixus. *Biomedica.* 2017; 37(3).
33. Castro-Salas M. Aspectos ecoepidemiológicos en la transmisión de la enfermedad de chagas en Santa Rosalia, Vichada. [Online].; 2013 [cited 2017 Mayo 17. Available from: [HYPERLINK "http://www.bdigital.unal.edu.co/11589/1/5598551.2013.pdf"](http://www.bdigital.unal.edu.co/11589/1/5598551.2013.pdf)
34. Canepa G. Genomica funcional de transportadores de aminoacidos y poliaminas de Trypanosoma cruzi. [Online].; 2010 [cited 2017 Septiembre 20. Available from:

HYPERLINK

"http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n4594_Canepa.pdf"

35. Higuera SL, Guhl F, D RJ. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *BMC-Parasites & Vectors*. 2013; doi: 10.1186/1756-3305-6-112.
36. Botero L, Mejía A, Triana O. Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. *Biomedica*. 2007; 27(1).
37. Ramirez J, Rendón L, Rosas F, Marin–Neto J, Morillo C, Guhl F. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients from Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(11).
38. Díaz M, Torres R, González C. Expresión diferencial entre estadios de *Trypanosoma cruzi* I en el aislamiento de un paciente con cardiomiopatía chagásica crónica de zona endémica de Santander, Colombia. *Biomedica*. 2011; 31(4).
39. Kollien A, Schaub G. The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today*. 2000; 16(9).
40. Lawrence R, Thomas O. In *Atlas de Parasitología Humana*. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2010. p. 161-165.
41. Hilarión LB. Caracterización epidemiológica de todos los casos reactivos y confirmados de *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre del Departamento de Caquetá de 1995 a 2010. Tesis. Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia, Salud Publica; 2013.
42. Verissimo AC, Montes TC, Carvalho CJ. *Manual de Capacitação:Trypanosoma cruzi para Microscopistas*. segunda ed. Rodrigues , editor. Rio de Janeiro; 2011.
43. Salvatella R. Los ciclos de transmisión de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Med Uruguay*. 1993; 9(1).
44. Rosas A, Ojeda G, Barrios A, Otteo M, Maruñak S. Tripanosomiasis americana en un canino del nordeste argentino. Reporte del caso clínico. *Rev. vet*. 2016; 27(1).
45. Rueda K, Trujillo J, Carranza J, Vallejo G. Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos.. *Biomedica*. 2014; 34(4).

46. Cucunubá Z, Valencia C, Puerta C, Sosa-Estani S, Torrico F, Cortés J, y col. Primer consenso colombiano sobre Chagas congénito y orientación clínica a mujeres en edad fértil con diagnóstico de Chagas. *ELSEVIER DOYMA Infectio*. 2014; 18(2): p. 50-65.
47. Díaz M, González C. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. *rev.univ.ind.santander.salud*. 2014; 46(2): p. 177-188.
48. Toso A, Vial F, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev. méd. Chile*. 2011; 139(2): p. 258-266.
49. Suárez D, Rey A, Orduz M, Prada R, Tarazona de Ramírez Z. Supervivencia de *Trypanosoma cruzi* en bebidas experimentalmente contaminadas. *Biomedica*. 2012; 31(1).
50. Manrique-Abril D, Manrique-Abril F, Lorca M, Ospina J. Prevalencia de anticuerpos para *Trypanosoma cruzi* en caninos de dos municipios endémicos de Boyacá. *rev. MVZ córdoba*. 2012; 17(1): p. 2916-2923.
51. Guhl F. Primer Taller Internacional sobre Control de la Enfermedad de Chagas, Curso de Diagnóstico, Manejo y Tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Primera ed. Guhl F, editor. Bogotá D.C: Ediciones Uniandes; 2005.
52. Mosca W, Campos Y, Briceño L. Inmunología e inmunopatología de la enfermedad de Chagas. Facultad de medicina universidad central de Venezuela.
53. Rosales D, Ortiz L. Infecciones parasitarias: Mecanismos de evasión de la respuesta inmune. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa*. 2008; 2(2): p. 89-98.
54. Osorio L, Ríos I, Gutiérrez B, González J. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *ELSEVIER Microbes and infection*. 2012; 14(15).
55. Palau M. Relación hospedero – parásito *Trypanosoma cruzi*. *MVZ - CORDOBA*. 2000; 5(1).
56. Izeppi W, Colindres S, Salguero de paz A. Determinación de la frecuencia de la enfermedad de Chagas en mujeres en edad fértil de la aldea El Chaperno, Jutiapa. Seminario de Investigación. Guatemala: UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA; 2016.
57. Natural reservoirs of *Trypanosoma cruzi*. *Bol. chil. parasitol*. 2000; 55(1-2).

58. Peñuela M, Valencia A. Seroprevalencia de Trypanosoma cruzi por la técnica de Western Blot en población canina del Departamento del Tolima, Colombia. Vet. Zootec. 2008; 2(2).
59. Curtis R, Zecca I, Roman V, Carbajal S, Auckland L, Flores I, y col. Trypanosoma cruzi (Agent of Chagas Disease) in Sympatric Human and Dog Populations in "Colonias" of the Lower Rio Grande Valley of Texas. ASTMH. 2017; 96(4).
60. Enfermedad de Chagas Tripanosomiasis Americana, Tripanosomiasis del Nuevo Mundo, Tripanosomiasis Sudamericana, Mal de Chagas, Enfermedad de Chagas-Mazza. [Online].; 2009 [cited 2017 Noviembre 15. Available from: HYPERLINK "http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/trypanosomiasis_american-es.pdf"
61. Pacheco JP, Oliveira V, Terranova E, Basmadjian Y, Gonzalez M, Heinsen T. Enfermedad de Chagas en perros: Descripción de un caso clínico en Raza Cimarrón y su diagnóstico histopatológico. REDVET- Rev. electrón. vet. 2009; 10(4).
62. Rojas L. La vía oral como forma de transmisión de la Enfermedad de Chagas. Una amenaza y un desafío creciente a tener en cuenta en su control integral. Rev Cubana Med Trop. 2014; 66(2).
63. Werner B, Heitmann I, Jercic I, Jofré L, Muñoz C, al e. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas 2006: Parte V. Diagnóstico de laboratorio. Rev. chil. infectol. 2008; 25(5).
64. Garfin D. Gel electrophoresis of proteins. 2003.
65. Mesa cml. plan de desarrollo 2012 – 2015 La Mesa apacible para vivir, atractiva para invertir. plan de desarrollo. Republica de Colombia; Departamento de Cundinamarca; 2012.
66. Alarcón Z, Juyo V, Larrotta J. Caracterización epidemiológica de parásitos gastrointestinales zoonóticos en caninos con dueño del área urbana del municipio de la mesa, Cundinamarca. Rev Med Vet Zoot. 2015; 62(1).
67. Science. AL. Hybond-C nitrocellulose membrane. Western blotting proteins, protocol for electroblotting proteins. .
68. Ospina S. Diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana.. Infectio. 2006; 10(4).

69. Guía de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas. [Online].; 2010 [cited 2017 Octubre 30. Available from: [HYPERLINK "http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=zoonosis-779&alias=207-guia-enfermedad-chagas-7&Itemid=518"](http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=zoonosis-779&alias=207-guia-enfermedad-chagas-7&Itemid=518)
70. Flórez A, Guasmayan L, Hernández D. 1ddd2. Guía para la vigilancia por laboratorio de enfermedad de Chagas. Dirección de redes en salud pública grupo de parasitología. 2014.
71. Riera C. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas. Ed Cont Lab Clín. 2013; 16(1).
72. Cantillo-Barraza O, Garcés E, Gómez-Palacio A, Cortés L. A, Pereira A, Marcet L. P, et al. Eco-epidemiological study of an endemic Chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae), dogs and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance, *Parasit Vectors*, vol. 8, p. 482, Sep 22 2015.
73. Patterson James S, Guhl F. Geographical distribution of Chagas disease. In: American Trypanosomiasis. Tibayrenc M, Editor. Oxford: Elsevier; 2010. p. 84-115
74. Strieter R. M, Belperio J. A, Keane M. P. Cytokines in innate host defence in the lung. *Clin invest*. 2002; 109: 699-705
75. Alcina A, Fresno M, Interaccion del *Trypanosoma cruzi* con el Sistema inmunitario. Centro de Biología Molecular. Universidad autónoma de Madrid. 2005. Vol 6 num 2
76. Aliberti J. C. S, Machado F. S, Souto J. T. B-chamokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependet microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Inf Immun* 1999; 67: 4819-26
77. Araujo F. F, Gomes J. A, Rocha M.O, Williams-Blangero S, Pinheiro V.M, Morato M. J, et al. Potential role of CD4+ CD25 HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. *Front Biosci*. 2007. 12:2097/2806).
78. Alcina A, Fresno M, Interaccion del *Trypanosoma cruzi* con el Sistema inmunitario. Centro de Biología Molecular. Universidad autónoma de Madrid. 2005. Vol 6 num 2
79. Rassi A. J, Rassi A, Marin-Neto J. A. Chagas disease. *Lancet*. 2010.17;375 (9723):1388-40

80. Souza P. E, Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect Immun Sep*, 2004, vol. 72, no. 9, p. 5283-91.
81. Galvis L, Mercado R, Zarate J, Molina Z. prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and small mammals in Nuevo León, Mexico. *Rev Argent Microbiol* 2017; 49:216-23
82. Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reuvidae: Triatominae) en Colombia. *D. Biomédica* vol.27. 2007.
83. Rassi A Jr, Rassi A, Rezende M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin*. 2012; 26: p 275–291.
84. Zingales B, Andrade S. G, Briones M. R, Campbell D. A, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, (2009) Vol. 104(7): 1051-1054
85. Deverl R, Fernandes O, Rodrigues J. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in Vitro culturing and mice infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Ene*, 2003; 98 (1): p 1-12
86. Miles M. A, Toyed P. J, Oswald S. C, Godfrey D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med & Hyg*. 1977; 71 (3)
87. Miles M. A, Lanham S. M, De Souza A, Póvoa M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans Roy Soc Trop Med & Hyg*. 1980; 74 (2)
88. Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala F. J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Nadl. Acad. Sci. USA. Ene*, 1986; 83: p 115-119

89. Gaunt M, Miles M. The Ecotopes and Evolution of Triatomine Bugs (Triatominae) and their Associated Trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Jul./Aug. 2000; 95 (4): p 557-565

90. Cardoso M, Reis-Cunha J, Bartholomeu D. Evasion of the immune Response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. Frontiers in Immunology. 2016 January; 6(659)