

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y CLÍNICAS ASOCIADAS A LA
INFECCIÓN NATURAL POR *Trypanosoma cruzi* EN PERROS (*Canis lupus
familiaris*) DEL ÁREA METROPOLITANA DE BUCARAMANGA, SANTANDER.



Presentado por:
LUCAS ANDRÉS MORENO SALCEDO

Tesis de investigación presentada a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Cooperativa de Colombia como requisito para optar al título de magister en salud y producción animal con énfasis en salud pública.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL CON
ÉNFASIS EN SALUD PÚBLICA
BUCARAMANGA, 2020

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y CLÍNICAS ASOCIADAS A
LA INFECCIÓN NATURAL POR *Trypanosoma cruzi* EN PERROS (*Canis
lupus familiaris*) DEL ÁREA METROPOLITANA DE BUCARAMANGA,
SANTANDER.



Presentado por:
LUCAS ANDRÉS MORENO SALCEDO
Médico Veterinario, cMsC.

Asesor:
JEICZON ELIM JAIMES DUEÑEZ
MVZ, MsC, PhD

Línea de estudio:
Salud pública

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL CON
ÉNFASIS EN SALUD PUBLICA
BUCARAMANGA, 2021

DEDICATORIA

En primer lugar, doy gracias a Dios por haberme dado la fortaleza y el valor para culminar esta etapa de mi vida, porque tengo la certeza que siempre está a mi lado y cada puerta que se abre, cada éxito, triunfo o logro alcanzado es gracias a él; porque me sostiene, me alienta y me muestra el camino a seguir.

Agradezco a mis padres, *Saúl Moreno Vesga* y *Gilma Esperanza Salcedo*, quienes me han formado por un sendero de valores, quienes, a través de su ejemplo, sacrificio y amor me han mostrado que la vida vale mucho la pena y todo lo puedo lograr con constancia, esfuerzo y dedicación. A mis hermanos; *Uday Camilo Moreno* y *Laura Paz Moreno*, porque han estado junto a mí en este largo proceso y caminar que se llama vida, porque me han acompañado en las decisiones que he tomado y han estado siempre para brindarme un abrazo y un consejo.

Agradezco a mis amigos, familiares y en especial a mis compañeros de estudio que tuve durante la maestría, porque han estado junto a mí en esta fase de mi vida, porque juntos hemos tenido que trasnochar, sacar tiempo de donde no lo había para cumplir con tareas, trabajos y lecturas, tuvimos que volver a retomar la etapa de estudio y así crecimos como profesionales y como personas, en especial agradezco a mi compañero *Omar Javier Suarez* porque lo conocí durante este proceso de estudio y se convirtió en un amigo para toda la vida.

Agradezco al profesor Dr. *Jeiczon Elim Jaimez Dueñez*, por abrirme las puertas al grupo de investigación en ciencias animales (GRICA) de la universidad Cooperativa de Colombia (UCC), así mismo valoro y agradezco su paciencia, su entrega, su don como docente, el darme la oportunidad de participar en esta investigación y ser ese apoyo académico durante toda esta etapa del postgrado.

Agradezco a mi jefe y amiga la Dra. *Arabia Marcela Bermúdez* por permitirme sacar tiempo y espacios de mi trabajo para dedicarlos al estudio y elaboración de este documento, valoro su comprensión, apoyo y compañía durante este proceso académico.

A todos los docentes, funcionarios e integrantes de la maestría en salud y producción animal por su colaboración, entrega y disposición en los procesos académicos y administrativos realizados durante mi maestría. Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida y este es el espacio para hacerlo porque han contribuido en mi crecimiento como persona, estudiante y profesional.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
3. MARCO TEÓRICO... ..	16
4. JUSTIFICACIÓN.....	18
5. OBJETIVOS.....	19
6. MATERIALES Y METODOS.....	20
Área de estudio y muestreo.....	20
Recolección y procesamiento de muestras de sangre.....	21
Diagnóstico parasitológico.....	21
Diagnóstico serológico.....	21
Diagnóstico molecular.....	22
Análisis clínico.....	23
Análisis radiográfico.....	23
Análisis estadísticos.....	24
Consideraciones éticas.....	24
7. RESULTADOS.....	25
Las pruebas serológicas demuestran una alta seroprevalencia de infección por <i>T. cruzi</i> asociada a condiciones sociodemográficas del AMB.....	25
La detección molecular de la infección por <i>T. cruzi</i> , evidencia la circulación activa del DTU I en perros del AMB.....	28
Los análisis clínicos sugieren que la infección por <i>T. cruzi</i> en caninos del AMB, se asocia a alteraciones hematológicas en los animales seropositivos.....	29
La infección por <i>T. cruzi</i> no se asocia con alteraciones del índice vertebral cardiaco en perros del AMB.....	31
8. DISCUSIÓN.....	32
9. CONCLUSIONES.....	36
10. RECOMENDACIONES.....	37
11. PRODUCTOS OBTENIDOS.....	38
12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	39
13. CERTIFICADOS.....	47

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Lista de iniciadores para los ensayos de PCR.....	23
Tabla 2. Análisis bivariado de factores asociados a la seropositividad de <i>T. cruzi</i> en perros del Área metropolitana de Bucaramanga, Santander.....	27
Tabla 3. Medidas y desviaciones estándar de los parámetros clínicos y hematológicos según el seroestado de <i>T. cruzi</i> en perros (n = 215) del Área Metropolitana de Bucaramanga, Santander	30
Tabla 4. Índice vertebral cardíaco de caninos positivos a la infección por <i>T. cruzi</i> ...	31
Figura 1. Ciclo doméstico de transmisión de <i>T. cruzi</i>	14
Figura 2. Prevalencia de infección de <i>T. cruzi</i> en perros del Área metropolitana de Bucaramanga, Santander. BU, FL, GI y PI, representan los municipios de Bucaramanga, Floridablanca, Girón y Piedecuesta, respectivamente	26
Figura 3. Razones de prevalencia (RP) obtenidas en el análisis multivariado (GEE) de la infección por <i>T. cruzi</i> en perros del Área metropolitana de Bucaramanga, Santander	28
Figura 4. Electroforesis de la segunda PCR empleando los iniciadores TCZ3 – TCZ4	28
Figura 5. Proporción de perros con valores hematológicos por debajo de los valores de referencia, comparado entre los tres tipos de infección a <i>T. cruzi</i>	30

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AMB	Área Metropolitana de Bucaramanga
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
HAI	Hemaglutinación indirecta
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DTU	Unidades discretas de tipificación
AST	Aspartato aminotransferasa
CK-MB	Creatin kinasa miocárdica
VHS	Índice vertebral cardiaco
OPS	Organización Panamericana de la Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
N	Norte
W	Oeste
msnm	Metros sobre el nivel del mar
mm	Milímetros de agua (precipitación pluvial)
EDTA	Anticoagulante
g	Fuerza centrífuga relativa
min	minutos
μl	Micro litro
FS	Frotis Sanguíneo
UI	Unidad internacional
IgG	Inmunoglobulina G
pb	Pares de base
Hto	Hematocrito
VCM	Volumen corpuscular medio
HCM	Hemoglobina corpuscular media
ASAT	Aspartato aminotransferasa
T4	Cuarta vertebra Torácica
GEE	Ecuaciones de estimación generalizada
RP	Razón de prevalencia

IC	Intervalo de confianza
Vs	Versus
P	Probabilidad que la hipótesis nula sea cierta
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
®	Marca registrada
>	Mayor que
<	Menor que
±	Más o menos
a	Proporcional

RESUMEN

Durante los últimos años, un aumento significativo en el número de brotes de Chagas agudo, ha sido observado en la región centro oriente de Colombia. Dada la importancia del perro doméstico (*Canis lupus familiaris*) como huésped reservorio y centinela de la infección por *Trypanosoma cruzi*, el presente estudio analizó las características epidemiológicas y clínicas asociadas a la infección de este hemoparásito en 215 perros del Área Metropolitana de Bucaramanga (AMB), Santander; la detección serológica de la infección se llevó a cabo mediante el ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), y la prueba de hemaglutinación indirecta (HAI), mientras que la detección molecular se realizó mediante la técnica de PCR anidada (nPCR), empleando los iniciadores dirigidos a la región micro satélite del ADN nuclear de *T. cruzi*. Los animales fueron definidos como seropositivos cuando al menos dos de las tres pruebas serológicas resultaron positivas y solo estos animales fueron evaluados mediante la técnica de nPCR. Para discriminar el DTU I de otros DTU de *T. cruzi*, se realizó una PCR multiplex dirigida hacia el gen miniexon del parásito. Paralelamente, las características clínicas y paraclínicas asociadas a la infección por *T. cruzi* en caninos del AMB, fueron evaluadas mediante el examen clínico, cuadro hemático, química sanguínea y análisis radiográficos.

Los sueros caninos mostraron una seropositividad del 27.9% (60/215), de los cuales el 43.3% (26/60) fueron positivos en la nPCR, en los cuales se determinó la infección por el DTU I. El análisis estadístico indicó que la seropositividad de *T. cruzi* en perros se asoció con los sectores socioeconómicos uno y dos, al igual que con la falta de recolección de desechos en estos municipios. Los análisis hematológicos mostraron que la infección con *T. cruzi* se asoció con signos de anemia y alteraciones plaquetarias, pero no con alteraciones de la Aspartato Aminotransferasa (AST), ni de la banda miocárdica de la creatina kinasa (CK-MB), tampoco se observó una asociación entre la seropositividad con alteraciones del índice vertebral cardíaco (VHS); descartando de esta manera posibles daños a nivel del miocardio.

En conclusión, la alta seroprevalencia de infección y la circulación activa de *T. cruzi* en perros del AMB, asociada a condiciones sociodemográficas específicas refleja el alto riesgo de infección para los humanos de estas localidades, lo cual debe tenerse en cuenta a la hora de implementar programas de control de la enfermedad de Chagas. Adicionalmente, los análisis clínicos y paraclínicos permitieron establecer el efecto de la infección por *T. cruzi* en el estado de salud de estos hospederos, lo cual debe tenerse en cuenta durante el cuidado y manejo de estos animales.

Palabras claves

Zoonosis, Chagas, Reservorio, Epidemiología, Exámenes clínicas y paraclínicas.

ABSTRACT

In recent years, an unusual increase in the number of oral acute outbreaks of Chagas disease has been reported in the center east of Colombia. Given the importance of the domestic dog (*Canis lupus familiaris*) as a reservoir host and sentinel of *Trypanosoma cruzi*, a serological and molecular study was carried out to detect infection by *T. cruzi* in 215 dogs from the Bucaramanga Metropolitan Area (AMB), Santander ; Serological detection of the infection was carried out using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Indirect Immunofluorescence (IFI) and indirect hemagglutination test (HAI), while molecular detection was performed using a nested PCR (nPCR) , targeting the microsatellite region of *T. cruzi* nuclear DNA. Animals were defined as seropositive when at least two of the three serological tests were positive and only these animals were evaluated by nPCR. To discriminate DTU from other DTUs of *T. cruzi*, a multiplex PCR targeting the miniexon gene of the parasite was performed. At the same time, the clinical and paraclinical characteristics of the canines were evaluated by means of a clinical examination, a blood count, blood chemistry and chest radiography.

The canine sera showed a seropositivity of 27.9% (60/215), of which 43.3% (26/60) were positive in the nPCR, and in which the infection by DTU 1 was determined. The statistical analysis indicated that the seropositivity of *T. cruzi* in dogs was associated with socioeconomic sectors 1 and 2, as well as with the lack of garbage collection in these municipalities. Hematological analyzes showed that infection with *T. cruzi* was associated with anemia and platelet alterations, but not with alterations in Aspartate Aminotransferase (AST) and the myocardial band of creatine kinase (CK-MB), neither was an association observed between the seropositive with alterations of the cardiac vertebral index (HSV); thus, ruling out possible damage to the myocardium.

In conclusion, the high seroprevalence of infection and the active circulation of *T. cruzi* in AMB dogs, associated with specific sociodemographic conditions, reflects the high risk of infection for humans in these localities, which should be taken into account when implementing Chagas disease control programs. Additionally, clinical and paraclinical analyzes made it possible to establish the effect of *T. cruzi* infection on the

health status of these hosts, which should be taken into account during the care and handling of these animals.

Keywords

Zoonosis, Chagas, Reservoir, Epidemiology, Clinical and paraclinical test

1. INTRODUCCIÓN

A nivel de Suramérica, los mamíferos domésticos y silvestres son considerados importantes reservorios de la infección por *Trypanosoma cruzi*; el cual es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas; en esta región, la infección por *T. cruzi* fue originalmente enzoótica y afectaba sólo los animales salvajes, principalmente mamíferos, convirtiéndose más adelante en una enfermedad de tipo zoonótico, la cual involucra a animales domésticos como caballos, vacas, perros y gatos dentro de su ciclo de transmisión (Cantillo-Barraza et al. 2015). Actualmente, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha estimado que aproximadamente de los 360 millones de personas que viven en países endémicos, alrededor de 18 millones están infectados, con 90 millones en peligro de infectarse (OPS/OMS, 2019). En Colombia, la prevalencia de infección por *T. cruzi* oscila entre el 1.4 y 2.5% de la población. Entre los departamentos con mayor incidencia se destacan; Santander y Norte de Santander, con un promedio de 19 casos semanales y una letalidad aproximada del 17.6% (Zingales et al., 2012).

En América Latina, el parásito *T. cruzi* se transmite principalmente por contacto con las heces o la orina de triatomíneos infectados que se alimentan de sangre de reservorios silvestres o domésticos. Por lo general, los insectos que albergan el parásito viven en las grietas y huecos de paredes, al igual que en los tejados y estructuras exteriores, como gallineros, corrales, almacenes, en zonas rurales y suburbanas; no obstante, otras vías de infección como el consumo de alimentos contaminados con *T. cruzi*, el contacto con secreciones, fluido sanguíneo de reservorios, transfusiones sanguíneas, transmisión transplacentaria, trasplante de órganos, y accidentes de laboratorio, juegan un papel importante en la epidemiología de esta infección (OPS/OMS, 2019).

En algunos países de Suramérica, los perros juegan un papel importante como reservorios y animales centinelas de la infección por *T. cruzi*, ya que estos actúan como una fuente alimenticia para los triatomíneos que cohabitan en áreas cercanas o dentro de las viviendas, los caninos entran en contacto frecuente con el ambiente selvático, desarrollando anticuerpos de memoria contra *T. cruzi* (Rueda et al., 2014; Llau et al., 2019) (Figura 1). En Colombia, estudios epidemiológicos realizados en perros de áreas endémicas para *T. cruzi*, han reportado prevalencias de infección entre el 1.6 y 27.5% mediante métodos moleculares, y seroprevalencias entre el 10.7 y 71.3%, demostrando la alta exposición de los perros al ciclo enzoótico de transmisión *T. cruzi*, demostrando el

riesgo que presenta los humanos al convivir con estos hospederos infectados (Díaz et al., 2015; Cantillo-Barraza et al. 2015; Jaimes-Dueñez et al. 2017). Algunos estudios en Argentina y Costa Rica, han demostrado que los animales infectados con *T. cruzi* no presentan signos de cardiopatías, mientras que estudios en Estados Unidos, mostraron lesiones en el miocardio de los animales infectados (Crisante et al., 2006; Estrada-Franco et al., 2006). Por lo anterior, algunos autores sugieren que al igual que en los humanos, los signos clínicos asociados a la infección por *T. cruzi* en caninos, pueden ser modulados por la presencia de diferentes genotipos del parásito (Guedes et al., 2012; Duz et al., 2014)).

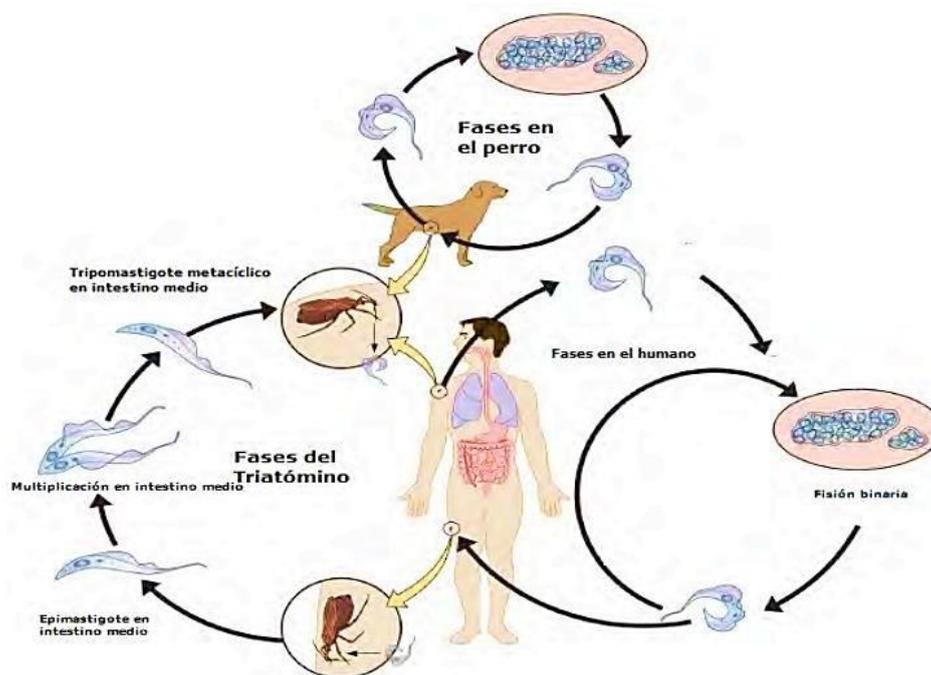


Figura 1. Ciclo doméstico de transmisión de *T. cruzi* (Tomado de Ruíz et al., 2015).

Dado que en Colombia los estudios epidemiológicos en caninos no han evaluado las manifestaciones clínicas asociadas a la infección por *T. cruzi*, la mayoría de los veterinarios presentan dificultades para orientar un diagnóstico rápido de esta infección, incrementando el riesgo de contagio en profesionales de la salud animal y tenedores de mascotas. Con el objetivo de identificar características clínicas asociadas a la infección de este hemoparásito en caninos de Colombia, el presente estudio evaluó las características clínicas y epidemiológicas asociadas a la infección por *T. cruzi* en caninos del AMB. Los resultados obtenidos, demuestran una alta seroprevalencia de infección asociadas a sectores sociodemográficos específicos, mientras los análisis clínicos y

paraclínicos, demuestran alteraciones hematológicas de tipo anémico, sin alteraciones cardiacas evidentes que comprometan la vida de estos animales.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia, uno de los más grandes retos a los que se ven enfrentadas las grandes ciudades es mantener un equilibrio entre el crecimiento urbanístico y su relación con los recursos naturales. El crecimiento urbanístico descontrolado a menudo desencadena la urbanización del área silvestre, bosques y zonas húmedas, donde se llevan a cabo los ciclos endémicos de transmisión de diversas especies tales como *T. cruzi*, *Leishmania* sp., rickettsias entre otras infecciones zoonóticas (Farnsworth, 2017), generando las condiciones favorables para posibles ciclos epizooticos de transmisión que pueden afectar a otras especies domesticas incluyendo al hombre.

Para el caso de Santander una de las enfermedades zoonóticas que más ha afectado históricamente esta población es la enfermedad de Chagas, una enfermedad parasitaria causada por el flagelado *T. cruzi*, de la familia Trypanosomatidae, el cual infecta a más de 200 personas anualmente en este departamento. Del total de los casos reportados en esta entidad territorial alrededor del 37% se presentan en el área urbana y un 10% en el AMB (Crisante et al., 2006; Estrada-Franco et al., 2006; Ramírez et al., 2013), resaltando la importancia de este parásito en la salud pública de esta comunidad.

Aunque en Colombia, los caninos de áreas urbanas y rurales han mostrado una prevalencia moderada a la infección por *T. cruzi*, las características clínicas y paraclínicas de la infección en estos hospederos, no son del todo descritas, de modo que el control sanitario de estos casos se hace cada vez más complejo, poniendo en riesgo la salud de los profesionales de la salud animal, y personas que cohabitan con estos caninos infectados. Teniendo en cuenta que el AMB es una zona endémica para la trasmisión de la enfermedad de Chagas, en la cual la prevalencia y características de los caninos infectados con este parásito no han sido estudiadas, el presente trabajo tiene como objetivo determinar las características clínicas y epidemiológicas asociadas a la infección natural por *T. cruzi* en perros del Área metropolitana de Bucaramanga, lo cual contribuirá a generar herramientas para orientar el diagnóstico rápido de esta infección, y determinará zonas de alto riesgo de transmisión que ameriten ser intervenidas por los organismos de control gubernamental.

3. MARCO TEÓRICO

La enfermedad de Chagas es una zoonosis parasitaria causada por el protozoo hemoflagelado *T. cruzi*, perteneciente al orden Kinetoplastida y familia Trypanosomatidae (WHO, 2007). La distribución de esta enfermedad, comprende gran parte del continente americano afectando a 21 países desde la Patagonia hasta el sur de Estados Unidos, con reportes esporádicos en Australia, África y Europa (WHO, 2007; Malafia et al., 2010; Antinori et al., 2017). Su principal mecanismo de transmisión es vectorial, a través de hemípteros de la subfamilia Triatominae, siendo igualmente importante, la transmisión oral, las transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos y la transmisión congénita (Telleria et al., 2017).

Dentro del mecanismo de transmisión vectorial existen dos ciclos básicos de importancia que corresponden a un ciclo silvestre y a un ciclo doméstico y/o peridoméstico, con constante superposición de ambos en varias regiones geográficas (Telleria et al., 2017). En el primero de ellos, el parásito realiza su ciclo de vida entre especies de mamíferos silvestres y los insectos triatominos que habitan en el ambiente selvático (Zingales et al., 2012). Por consiguiente, los humanos y animales domésticos se infectan ocasionalmente cuando entran en contacto con triatominos de este hábitat natural, o bien cuando estos últimos invaden las viviendas al ser atraídos por la luz o en busca de fuentes alimenticias (Omar-Cantillo et al., 2010). Con respecto al ciclo doméstico, este involucra principalmente especies de triatominos domiciliados (*Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*), los cuales al alimentarse de reservorios infectados pueden transmitir el parásito a los humanos y/o animales domésticos específicamente dentro de las viviendas o áreas afines (Telleria et al., 2017). En Colombia, ambos ciclos de transmisión han sido descritos, reportándose un total de 26 especies de triatominos (Guhl, 2007); de los cuales 15 de ellos se han encontrados naturalmente infectados con *T. cruzi* e involucrados en los diferentes ciclos de transmisión (Hernández et al., 2016a).

En lo que compete a la transmisión oral, la ingestión de insectos y/o reservorios infectados entre animales silvestres es considerada la principal ruta de transmisión en este medio natural y por lo cual hace parte habitual del ciclo enzoótico de *T. cruzi*, y de la incorporación de este a la cadena alimenticia (Hernández et al., 2016b). En términos epidemiológicos, la transmisión oral es quizás la principal causa de brotes agudos de infección, presentados en áreas sin presencia de insectos vectores domiciliados (Pereira

et al., 2010). En este sentido, la contaminación accidental de alimentos, a través de vectores silvestres infectados que ingresan esporádicamente a las viviendas o mamíferos infectados intrusos, es uno de los fenómenos que más preocupa los organismos de salud, ante la posibilidad de presentarse brotes de infección con altas tasas de mortalidad (Pereira et al., 2010). Como escenarios ecoepidemiológicos asociados a estos brotes de transmisión, se ha sugerido la destrucción de los ecosistemas selváticos, la disminución de hábitats especializados, la extensión de la barrera agrícola, la sub urbanización y pérdida de la diversidad de mamíferos (Hernández et al., 2016a). Estas variaciones en los ecosistemas, favorecen que especies de mamíferos reservorios como *Didelphis marsupialis* (zarigüeya), con una alta capacidad de transmisión de *T. cruzi*, habiten áreas próximas a las viviendas y establezcan contacto directo con animales domésticos y otras especies sinantrópicas como los roedores. De esta manera, a través del contacto con sus secreciones o consumo directo de la carne de estos reservorios, los caninos comienzan a hacer parte fundamental del ciclo enzoótico de transmisión de *T. cruzi* a nivel de los peridomicilios (Xavier et al., 2012).

Aunque un alto número de animales domésticos se han encontrado infectadas con *T. cruzi* (Cantillo-Barraza et al. 2015), el perro presenta características particulares que lo convierten en un importante y llamativo reservorio del parásito en diversas zonas endémicas. Entre estas se destaca; la mayor preferencia de los triatominos por alimentarse de esta especie animal que del humano, la mayor capacidad de transmitir el parásito hacia los triatominos comparado con el hombre, la posibilidad de alimentarse de otros hospederos reservorios y su estrecha asociación al ambiente peridoméstico y eventualmente selvático según su lugar de hábitat (Crisante et al., 2006). Por tal motivo, la infección por *T. cruzi* en perros en cohabitación con los vectores, es considerado un factor de riesgo para la transmisión de la enfermedad de Chagas a nivel domiciliario (Cardinal et al., 2006).

4. JUSTIFICACIÓN

En Colombia se estima que alrededor de 700.000 a 1.200.000 habitantes están infectados con *T. cruzi*, y alrededor de unos 8.000.000 viven en riesgo de infección. La importancia de los perros en este contexto se relaciona con el hecho de que son los principales animales domésticos que viven en las proximidades de los seres humanos y están dentro del ciclo de transmisión de este parásito, adicionalmente los perros pueden desarrollar alteraciones patológicas similares a las detectadas en los humanos, considerándose el modelo experimental de elección para la enfermedad de Chagas (OPS/OMS, 2019).

En este país, cada año se presentan cerca de 5.250 casos nuevos en humanos, de los cuales entre el 10 y el 20% desarrollan cardiopatía Chagásica, y alrededor del 10% una cardiopatía dilatada, de los cuales cerca del 84% fallecen en la siguiente década producto de los signos cardiacos progresivos. Entre los departamentos de mayor prevalencia se destacan; Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Meta, Casanare y Arauca, donde la presencia de insectos triatomíneos, adaptados a hábitats humanos (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *T. venosa* y *T. maculata*) representan un riesgo de infección mediante la transmisión vectorial.

Considerando que el AMB es un área históricamente afectada por brotes de la enfermedad de Chagas, y sumado a que en Colombia las manifestaciones clínicas y paraclínicas asociadas a la infección por *T. cruzi* en caninos no han sido estudiadas, el presente estudio buscó determinar las características epidemiológicas y clínicas asociadas a la infección por *T. cruzi* en la población de estudio, a fin de establecer variables socio demográficas asociadas a la infección, y conocer el efecto de este hemoparásito en la salud de estos hospederos.

5. OBJETIVOS

General

- Determinar las características epidemiológicas y clínicas asociadas a la infección por *T. cruzi*, en caninos del Área Metropolitana de Bucaramanga, Santander.

Específicos

- Determinar las variables epidemiológicas asociadas a la infección por *T. cruzi* en caninos del Área Metropolitana de Bucaramanga, Santander.
- Identificar áreas con focos activos de transmisión de *T. cruzi* en caninos, y establecer el riesgo epidemiológico de transmisión hacia los humanos.
- Describir las características clínicas y paraclínicas asociadas a la infección por *T. cruzi* en caninos del Área Metropolitana de Bucaramanga, Santander.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio y muestreo

Entre enero y agosto del 2019, se realizó un estudio transversal en caninos del AMB, la cual comprende los municipios de Bucaramanga, Floridablanca, Girón y Piedecuesta, en el departamento de Santander. Esta zona se ubica en el noreste de Colombia (latitud, 7° 08 '00 N; longitud, 73° 08' 00 W), a una altitud promedio de 959 msnm (Figura 1). La zona ecológica está formada por bosques secos tropicales rodeados de montañas, cultivos y parches de bosque nativo, con una precipitación promedio de 1159 mm / año y una biotemperatura promedio anual de 23.4 °C (IDEAM, 2014). La transmisión de *T. cruzi* en esta región está modulada por la amplia distribución de especies invasoras de triatominos (*Panstrongylus geniculatus* y *Rhodnius pallescens*), al igual que mamíferos salvajes (*Didelphis marsupialis*) en el intra domicilio y peri domicilio.

El muestreo se realizó en 18 sectores urbanos (nueve en Bucaramanga, cuatro en Floridablanca, tres en Girón y dos en Piedecuesta) del AMB durante el programa de censos y planes de vacunación antirrábica establecidos por el programa de control de Zoonosis departamental. Estos sectores fueron delimitados estratégicamente por las secretarías de salud encargadas, con el objetivo de atender la totalidad de la población canina en estos municipios. El tamaño de la muestra se calculó utilizando el programa Epi Info 7.0 (www.cdc.gov), considerando una población de 70.000 perros en el área de estudio, un 15% de probabilidad de estar infectados según Cantillo-Barraza et al. (2015), un intervalo de confianza del 95% y un error estadístico del 5%. El tamaño de la muestra estimado fue 195 animales, pero se incrementó en un 10% para compensar los errores de muestreo. Dentro de cada municipio, el tamaño de la muestra se estimó según el porcentaje de ciudadanos en el mismo, que corresponde al 50%, 25%, 15% y 10% para Bucaramanga, Floridablanca, Girón y Piedecuesta, respectivamente. Los criterios de inclusión para los perros seleccionados fueron los siguientes: (i) haber sido nacidos y criados en el área de estudio, (ii) tener un dueño que los reconociera y (iii) que este último estuviese dispuesto a brindar información básica del animal (es decir; edad, raza, origen y estado de salud en general). Durante el muestreo, los animales se seleccionaron aleatoriamente mediante procedimientos computarizados realizados en Excel v.16.0. A los dueños de los animales seleccionados, se les pidió diligenciar un consentimiento informado con el fin de dar a conocer los riesgos y beneficios de su participación en el

estudio. Además, se les formuló un cuestionario con doce preguntas relacionados con variables epidemiológicas asociadas a la enfermedad de Chagas. En el cuestionario, el nivel socioeconómico fue definido según las divisiones establecidas para Colombia: nivel 1; bajo-bajo, nivel 2; bajo, nivel 3; superior-bajo, nivel 4; medio; nivel 5; medio-alto; y nivel 6; alto (Farnsworth, 2017).

6.2 Recolección y procesamiento de muestras de sangre

Por cada animal, se recolectaron dos muestras de sangre de 5 ml de la vena radial, utilizando tubos vacutainer con y sin EDTA K3, los cuales fueron almacenados a 4°C hasta su procesamiento. Para la extracción de suero, las muestras se centrifugaron a 5000g durante 10 min, y el suero se almacenó a -20°C hasta su uso en los ensayos serológicos. El ADN genómico se extrajo de 200 µL de sangre con EDTA utilizando el kit de purificación de ADN (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen ®), según las instrucciones dadas por el fabricante.

6.3 Diagnóstico parasitológico

El diagnóstico parasitológico de la infección por *Trypanosoma* spp., se realizó mediante análisis de frotis sanguíneo (FS) y la prueba de Woo; Los frotis fueron sometidos a examen microscópico utilizando el objetivo 100X, un total de 50 campos fueron observados antes de que la muestra se considerara negativa para *Trypanosoma* spp., u otros agentes hemotrópicos. Para la prueba Woo, la sangre del tubo con EDTA se transfirió dentro de un periodo de tiempo no mayor a 6 horas luego de la toma de muestras a un tubo de microhematocrito con heparina sódica (80 UI/ml) (Vitrex Medical, Herlev, Dinamarca) y se selló en un extremo. Los tubos capilares se centrifugaron en una centrífuga de microhematocrito durante 5 min a 5000 g. La motilidad de los tripanosomas se evaluó según el procedimiento descrito por Woo (1970).

6.4 Diagnóstico serológico

La detección de anticuerpos anti *T. cruzi* (IgG) se realizó mediante tres pruebas serológicas; ELISA, IFI e HAI, las cuales tienen una sensibilidad y especificidad > 98% (Xavier et al., 2012; CantilloBarraza et al., 2015). En los dos primeros métodos, el

antígeno se preparó a partir de epimastigotes recolectados de cepas Colombianas de *T. cruzi* (Cas-15 y Gal-61), anteriormente clasificadas como TcI (Rojas et al., 2007). Para el ELISA, se utilizó un lisado completo extraído de epimastigotes como antígeno, mientras que para IFI, el antígeno se obtuvo de epimastigotes completos. La prueba HAI se realizó utilizando la prueba Chagastest HAI disponible comercialmente, según las recomendaciones dadas por el fabricante (Wiener Laboratories Rosario, Argentina). Las muestras que mostraban inhibición de la hemaglutinación en la dilución 1:16 se consideraron positivas. Los animales fueron definidos como seropositivos cuando al menos dos de las tres pruebas realizadas mostraron resultados positivos, según lo recomendado por Jaimes-Dueñez et al. (2017).

6.5 Diagnóstico molecular

Dada la baja prevalencia de ADN de *T. cruzi* en perros seronegativos (Curtis-Robles et al., 2017), solo se evaluaron animales seropositivos para la detección de ADN del parásito según lo recomendado en estudios anteriores (Cantillo-Barraza et al., 2015; Jaimes-Dueñez et al., 2017; Cantillo-Barraza et al., 2020). Para ello, una PCR anidada (nPCR) dirigida a la región de microsatélites del ADN nuclear de *T. cruzi* se realizó en este grupo de animales como se describió previamente por Marcon y col. (2002) con algunas modificaciones. Se utilizaron los iniciadores TCZ1 / TCZ2, y TCZ3 / TCZ4 para la primera y segunda reacción, respectivamente (Moser y col., 1989).

Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, se tiñeron con EZ-vision (Amresco, Solon, Estados Unidos) y se visualizaron bajo luz ultravioleta. Los animales se consideraron positivos para *T. cruzi* cuando se observó un producto de PCR de 149 pb en la electroforesis de la segunda PCR (Marcon et al., 2002). Los controles de PCR positivos y negativos se obtuvieron de muestras de sangre de caninos previamente caracterizados para la infección de *T. cruzi* en regiones endémicas de Colombia (Cantillo-Barraza et al. 2015).

Para discriminar el DTU I de otros DTU del parásito, las muestras positivas a *T. cruzi*, fueron sometidas a una PCR multiplex dirigida al gen miniexon (SL-IR) como se reportó por Villa et al., 2013. Los iniciadores y condiciones de PCR empleadas en los análisis moleculares, son citados en la (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de iniciadores utilizados para los ensayos de PCR.

Organismo	AND Objetivo	Primer	Secuencia de oligonucleótido (5'-3')	Amplicon (bp)	Temperatura aplicada	Referencias
<i>T. cruzi</i>	Microsatélite (nPCR)	TCZ1	CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT	~188	55 °C	(Moser et al., 1989)
		TCZ2	CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG			
<i>T. cruzi</i>	Microsatélite (nPCR)	TCZ3	TGCACTCGGCTGATCGTTT	~149	55 °C	(Moser et al., 1989)
		TCZ4	ATTCTCCAAGCAGCGGATA			
<i>T. cruzi</i>	Mini-exón	TC	CCCCCTCCCAGGCCACACTG	~300	55 °C	(Souto et al., 1996)
		TC1	GTGTCCGCCACCTCTTCGGGCC			
		TC2	CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG			

(Fuente: archivo personal)

6.6 Análisis clínico

Durante el procedimiento de toma de muestras, todos los perros fueron sometidos a un examen clínico que incluía la evaluación de la temperatura corporal, la condición corporal, la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria, el color de la membrana mucosa y el tiempo de llenado capilar, todos estos procedimientos fueron realizados por un médico veterinario, o en su defecto por un practicante de medicina veterinaria. A partir de las muestras de sangre, se realizó la medición de eritrocitos y leucocitos totales, hematocrito (Hto), hemoglobina, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de MCH (CHCM), recuentos de plaquetas y leucocitos. Los recuentos diferenciales se determinaron utilizando un contador automático ABC VET® (Scil Animal Care Company, Gurnee, EE. UU). Finalmente, se realizó la determinación cuantitativa de la Aspartato Aminotransferasa (ASAT) y la banda miocárdica de Creatina Quinasa (CK-MB) utilizando el kit comercial Spinreact® (Girona, España) siguiendo los protocolos del fabricante.

6.7 Análisis radiográficos

Con el fin de identificar alteraciones del tamaño cardíaco asociadas a la infección por *T. cruzi*, se realizó un estudio radiográfico a diez caninos seropositivos (cinco negativos por nPCR, y cinco positivos por nPCR), a los cuales se les tomó cuatro vistas radiográficas; latero-lateral derecha, latero-lateral izquierda, dorso ventral y ventro dorsal, empleado un equipo de rayos X veterinario marca SOYEE (ref SY31-100P) con un

máximo espesor de 30cm.

Como indicador del tamaño estándar del corazón, se estimó el índice vertebral cardiaco (VHS), el cual se valora tomando la medida del eje longitudinal cardiaco (desde la base de la carina hasta el ápex cardíaco) y el eje corto (máximo eje perpendicular al longitudinal en el tercio medio), para posteriormente compararlos con el número de vertebras desde la faceta anterior de la T4, hacia la parte caudal según lo reportado por Buchanan et al., 2000. Los valores de referencia e intervalos de confianza para cada raza fueron establecidos con base en la literatura científica (Buchanan et al., 2000; Bavegems et al., 2005; Jepsen-Grant et al., 2013; Luciani et al., 2019)

6.8 Análisis estadístico

Con el objetivo de desarrollar modelos que puedan explicar la variable dependiente (seropositividad *T. cruzi*) en función de cada una de las doce variables independientes relacionadas con las condiciones medioambientales, socioeconómicas y de cada hospedero (Tabla 1), ecuaciones de estimación generalizada (GEE) se ejecutaron utilizando una distribución binomial en el programa SPSS v.18.0. Aquellos con una asociación estadística ($P < 0.25$, en la prueba de χ^2 , según Hosmer y Lemeshow, 2005) se probaron en el modelo multivariado utilizando un método escalonado. El nivel de diferencia estadística en el modelo multivariado se estableció en un $P < 0.05$. Los resultados se expresaron como Exp (B) [una estimador de la razón de prevalencia (PR)], y su respectivo intervalo de confianza al 95% (IC 95%). Finalmente, con el objetivo de estimar prevalencias parciales los animales se dividieron en tres grupos de acuerdo con el diagnóstico serológico y los resultados de la nPCR: (i) seronegativos, (ii) seropositivos sin parasitemia activa (seropositivos y nPCR-negativos), y (iii) seropositivos con parasitemia activa (seropositivos y nPCR-positivos).

Las diferencias en los rasgos clínicos se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) o el método de Kruskal – Test de Wallis, según el resultado del test de normalidad de Shapiro-Wilk. Las proporciones de animales con valores hematológicos por debajo de los valores de referencia se compararon utilizando la prueba de χ^2 . Los análisis de datos se realizaron en el software estadístico SPSS v.18.0.

6.9 Consideraciones éticas

Todos los animales se manipularon de acuerdo con las buenas prácticas animales definidas por el código de prácticas colombianas para el cuidado y uso de animales para fines científicos, establecidos por la Ley 84 de 1989. El aval de bioética fue otorgado por el Comité de Ética Animal de la Universidad Cooperativa de Colombia, campus Bucaramanga, establecido bajo la resolución rectoral 059 del 2009.

7. RESULTADOS

Se examinaron un total de 215 perros, de los cuales el 66.5% eran hembras y el 56.7% animales de raza criolla. Otras razas predominantes incluyeron el Labrador Retriever (12.1%), Pinscher (9.7%), Schnauzer (3.7%) y Pitbull (2.7%). La edad media y la desviación estándar fue 3.4 ± 2.9 años (rango, 1 mes a 17 años). Ningún animal fue positivo para la infección por *Trypanosoma* spp., mediante los análisis parasitológicos. Sin embargo, un total de cuatro (1.8%, IC 95% = 0,04% - 3,6%), tres (1,4%, IC 95% = - 0,19% - 2,9%) y dos perros (0,9%, IC 95% = -0,36% - 2,2%) fueron positivos para *Hepatozoon* spp., *Dirofilaria* spp., y *Ehrlichia* spp., respectivamente, mediante el análisis de frotis sanguíneo. Ningún animal manifestó alteraciones graves de su estado de salud durante el examen clínico.

7.1 Las pruebas serológicas demuestran una alta seroprevalencia de infección por *T. cruzi* asociada a condiciones sociodemográficas del AMB.

En la detección serológica de la infección por *T. cruzi*, un total de 60 perros (27.9%, IC 95% = 21.8% - 33.9%) fueron positivos a la infección mediante al menos 2 pruebas serológicas. El método ELISA fue el método que identificó la mayoría de las muestras seropositivas (37.6%, IC 95% = 30.7% - 43.7%), seguido de la IFI (28.3%, IC 95% = 21.9% - 34.1%) y de la HAI (16.7%, IC 95% = 11.7% - 21.7%), respectivamente. El mayor grado de concordancia se observó entre la prueba de ELISA e IFI. La prevalencia de infección en Piedecuesta, Bucaramanga, Girón y Floridablanca fue de 31.6% (IC 95% = 8.5% - 54.6%), 29.8% (IC 95% = 21.4% - 38.0%), 28.1% (IC 95% = 11.6% - 44.5%) y 20.9% (IC 95% = 8.2% - 33.6%), respectivamente (Figura 2). Los perros de hogares donde los propietarios informaron haber notado insectos tenían una mayor prevalencia de infección (40.3%; IC 95% = 26.5 % - 54.1%) que los que vivían en hogares donde los propietarios no notaron estos insectos (23.9% IC 95% = 17.3 % - 30.5%).

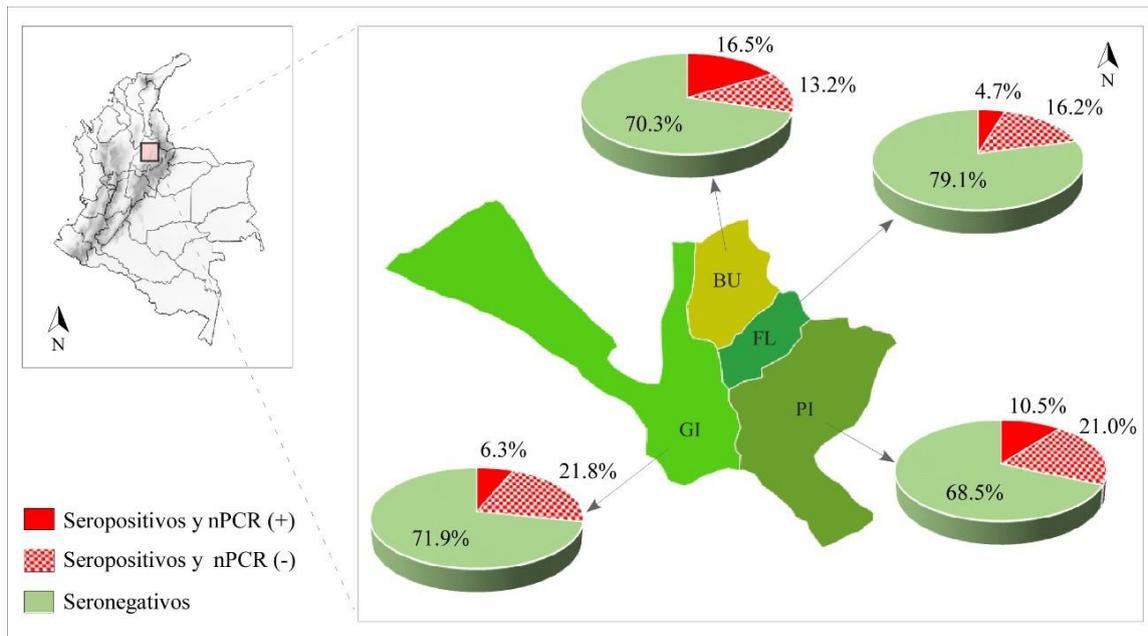


Figura 2. Prevalencia de infección de *T. cruzi* en perros del Área Metropolitana de Bucaramanga, Colombia. BU, FL, GI y PI, representan a Bucaramanga, Floridablanca, Girón y Piedecuesta, respectivamente.

(Fuente: archivo personal)

En el análisis univariado, la seroprevalencia de infección por *T. cruzi* en perros se asoció estadísticamente ($P < 0.25$) con todas las variables independientes, excepto con la variable municipio, grupo de edad y sexo (Tabla 2). Sin embargo, cuando estas variables se sometieron a un análisis multivariado, sólo el nivel socioeconómico (1 vs 2 [RP = 1,37, IC del 95% = 1,12 - 1,68] y 3 vs 2 [RP = 0,48, IC del 95% = 0,26 - 0,87]) y la recolección de desechos sólidos (no vs sí [RP = 1,66, IC del 95% = 1,22 - 2.26]) estuvieron significativamente asociados a la infección por *T. cruzi* ($P < 0.05$) (Figura 3).

Tabla 2. Análisis bivariado de factores asociados a la seropositividad de *T. cruzi* en perros del Área metropolitana de Bucaramanga, Santander.

Variables independientes	Animales examinados	Positivos	Prevalencia (%)	<i>P</i>
Municipio				
Bucaramanga	121	36	29.7	0.716
Floridablanca	43	9	20.9	
Girón	32	9	28.1	
Piedecuesta	19	6	31.5	
Nivel socioeconómico				
Uno	116	42	36.2	0.009
Dos	26	7	26.9	
Tres	73	11	15.1	
Tipo de techo				
Techo de concreto	121	30	24.7	0.180
Techo de Zinc	56	21	37.5	
Tejas	38	9	23.6	
Material de las paredes				
Concreto	187	47	25.1	0.000
Barro	18	9	50	
Madera	10	4	40	
Recolección de desechos				
Si	191	49	25.6	0.042
No	24	11	45.8	
Número de mascotas				
0–5	170	40	23.5	0.006
> 5	45	20	44.4	
Otros animales domésticos				
Si	41	16	39.0	0.081
No	174	44	25.2	
Errores observados				
Si	52	21	40.3	0.023
No	163	39	23.9	
Grupo de edad				
Cachorro (1 m–<1 y)	57	12	21.0	0.395
Adulto (≥1 y–<7 y)	127	46	29.9	
Geriatrico (≥7 y)	31	2	32.2	
Sexo				
Hembra	143	40	27.9	0.976
Macho	72	20	27.7	
Tamaño de la raza				
Grande	43	12	27.9	0.128
Mediano	132	42	31.8	
pequeño	40	6	15.0	
Tipo de alimentación				
Pellet	74	16	21.6	0.139
Concentrado y desperdicio de alimentos	141	44	31.2	

Nota: Las asociaciones estadísticas según Hosmer y Lemeshow, 2005 ($P < 0,25$ en la prueba χ^2), se muestran en negrita.

(Fuente: archivo personal)

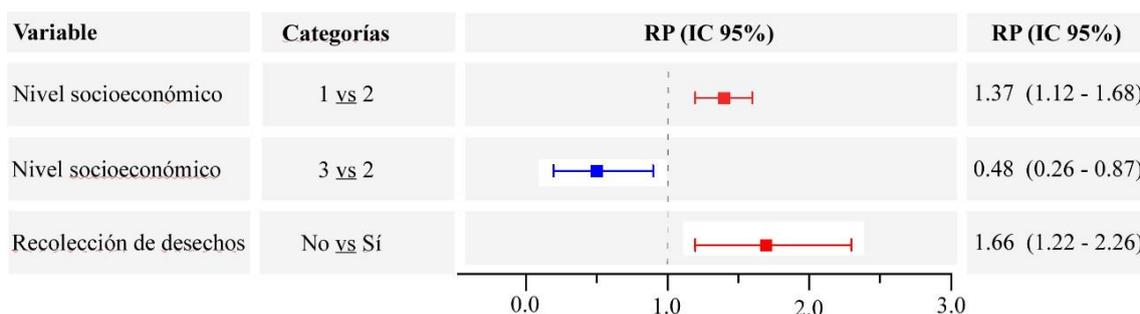


Figura 3. Razones de prevalencia (RP) obtenidas del análisis multivariado (GEE) de la infección por *T. cruzi* en perros del AMB. Todas las razones de prevalencia de las variables independientes se discriminan por comparación de categorías. Los cuadrados y las barras horizontales representan la RP con su respectivo IC 95%.

(Fuente: archivo personal)

7.2 La detección molecular de la infección por *T. cruzi*, evidencia la circulación activa del DTU I en perros del AMB

De un total de 60 perros seropositivos evaluados mediante el método nPCR, 26 (43.3%, IC 95% = 30,0% - 56,0%), amplificaron el ADN nuclear del marcador satélite de *T. cruzi* (Figura 4). Los animales positivos a la nPCR tuvieron una prevalencia del 55.5% (IC 95% = 38,5% - 72,6%), 33.3% (95% IC = 20,8% - 87,5%), 22.2% (95% IC = 11,6% - 56,1%) y 22,2% (95% IC = 11,6% - 56,1%) en los animales seropositivos de Bucaramanga, Piedecuesta, Girón y Floridablanca, respectivamente (Figura 2).

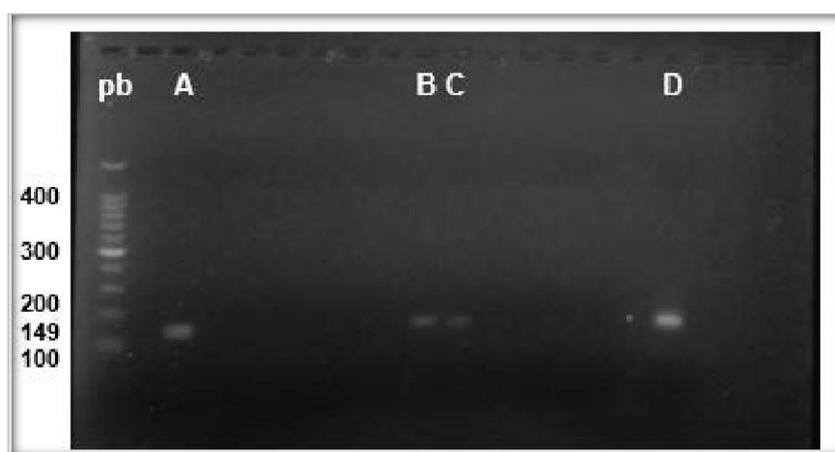


Figura 4. Electroforesis de la segunda PCR empleando los iniciadores TCZ3 – TCZ4. Nota: Carril pb: patrón de peso molecular de 100pb (Promega®); carril A, B y C: muestras positivas; carril D: control positivo del ADN molde de *T. cruzi*.

(Fuente: archivo personal)

El análisis estadístico no mostró ninguna asociación significativa entre la infección activa y el municipio. Los resultados de la PCR multiplex para el gen mini exón, evidenciaron la presencia del DTU I en una de las muestras positivas mediante métodos moleculares. Las demás muestras positivas a la nPCR, no amplificaron con éxito este marcador.

7.3 Los análisis clínicos sugieren que la infección por *T. cruzi* en caninos del AMB, se asocia a alteraciones hematológicas en los animales seropositivos.

Para los análisis clínicos, los animales se dividieron en tres grupos de acuerdo con el diagnóstico serológico y los resultados de la nPCR: (i) seronegativos, (ii) seropositivos sin parasitemia activa (seropositivos y nPCR-negativos), y (iii) seropositivos con parasitemia activa (seropositivos y nPCR-positivos). Con respecto al recuento de eritrocitos, se observaron valores más bajos en el grupo de los seropositivos, comparado con el grupo de perros seronegativos. Para la hemoglobina y el Hto, se observaron valores más bajos en perros seropositivos con parasitemia activa que en perros seronegativos. Los valores de VCM y CHCM fueron más altos en los perros seropositivos con parasitemia activa que en el grupo de los seronegativos, mientras que los recuentos de plaquetas fueron más altos en los seropositivos con parasitemia activa que en los seropositivos sin parasitemia activa (Tabla 3).

Al comparar la proporción de animales con valores inferiores a los de referencia entre los tres grupos, se observaron diferencias significativas en el RGR, Hb, Hto y CHCM (Prueba de χ^2 , $P < 0,05$), lo que indica que la proporción de animales con desviaciones graves en estos parámetros dependen del tipo de infección con *T. cruzi* (Figura 5). De otro lado, los valores de AST y CK-MB fueron mayores en el grupo seronegativo que en el grupo de infección crónica con parasitemia activa. No se observaron valores anormales de AST y CK-MB en ninguno de los tres grupos de perros.

Tabla 3. Medias y desviaciones estándar de parámetros clínicos y hematológicos según el seroestado de *T. cruzi* en perros (n = 215) del Área metropolitana de Bucaramanga, Colombia.

Parámetro	Referencia	Seronegativo	Seropositivo y nPCR-negativo	Seropositivo y nPCR-positivo	P
Clínica					
Condición corporal, 1 a 5	-	3.1 ± 0.4	3.0 ± 0.4	3.1 ± 0.6	0.846
Temperatura, ° C	38–39.2	38.8 ± 0.5	38.7 ± 0.4	38.7 ± 0.6	0.899
Tiempo de llenado capilar, segundos	1–2	2.2 ± 0.4	2.2 ± 0.4	2.2 ± 0.4	0.234
Frecuencia cardíaca, latidos / min	60–180	108.5 ± 22.7	109.6 ± 20.7	107.3 ± 19.5	0.846
Frecuencia respiratoria, respiraciones / min	10–30	43.8 ± 27.9	40.1 ± 27.9	37.3 ± 27.2	0.393
Hematológica					
Glóbulos rojos, 1 x 10 ⁶ / μL	4.8–9.3	8.5 ± 2.1 ^a	7.0 ± 2.6 ^b	6.9 ± 1.8 ^b	0.001 ^{*A}
Hemoglobina, g / dL	12.1–20.3	14.1 ± 2.3 ^a	12.4 ± 2.8 ^b	19.7 ± 5.6	0.001 ^{*A}
Hematocrito, %	36–60	42.3 ± 7.1 ^a	37.3 ± 8.4 ^b	39.2 ± 8.5	0.001 ^{*A}
Volumen corpuscular medio, fL	58–79	51.5 ± 10.4 ^b	58.0 ± 19.5	59.2 ± 16.8 ^a	0.005 ^{*K}
Hemoglobina corpuscular media, pg	19–26	17.1 ± 3.4 ^b	19.3 ± 6.5	19.7 ± 5.6 ^a	0.005 ^{*K}
Plaquetas, 1 x 10 ³ / μL	170–400	255.0 ± 78.2	220.5 ± 44.5 ^b	251.7 ± 76.6 ^a	0.049 ^{*A}
Glóbulos blancos, 1 x 10 ³ / μL	4,000–15,500	13,667 ± 5,738	13,694 ± 5,956	13,973 ± 6,626	0.957
Neutrófilos, 1 x 10 ³ / μL	2,060–10,600	8,044 ± 4,251	7,909 ± 4,014	7,681 ± 3,996	0.776
Linfocitos, 1 x 10 ³ / μL	690–4,500	4,270 ± 2,490	4,659 ± 2,889	4,068 ± 1,529	0.825
Monocitos, 1 x 10 ³ / μL	0–840	301.9 ± 361.8	222.0 ± 217.0	348.5 ± 321.3	0.307
Eosinófilos, 1 x 10 ³ / μL	0–1,200	1,052 ± 1,233	903.3 ± 1,163	1,876 ± 2,960	0.009
AST, U/L	15–66	29.4 ± 11.2 ^a	28.8 ± 8.1	24.9 ± 8.0 ^b	0.042 ^{*K}
CK-MB U/L	26.2–75.0	38.5 ± 24.8 ^a	32.2 ± 15.6	27.1 ± 11.9 ^b	0.046 ^{*K}

Nota: ^{*A} y ^{*K}, representan los valores significativos que fueron analizados mediante la prueba de ANOVA o Kruskal wallis, respectivamente.

(Fuente: archivo personal)

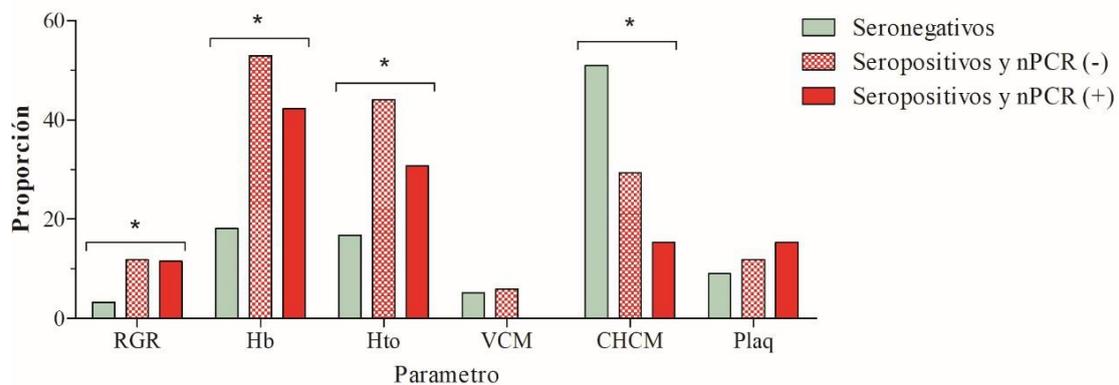


Figura 5. Proporción de perros con valores hematológicos por debajo de los valores de referencia, comparado entre los tres tipos de infección a *T. cruzi*. Los análisis comparativos fueron realizados mediante la prueba de Chi-cuadrado ($P < 0.05$).

(Fuente: archivo personal)

7.4 La infección por *T. cruzi* no se asocia con alteraciones del índice vertebral cardiaco en perros del AMB

Luego de analizar los valores obtenidos en el índice vertebral cardiaco de cinco perros seropositivos sin parasitemia activa, y cinco con parasitemia activa, no se observan valores anormales con respecto a los valores de referencia, indicando que en estos animales no se presentan alteraciones morfológicas en el tamaño del corazón (Tabla 4).

Tabla 4. Índice vertebral cardiaco de caninos positivos a la infección por *T. cruzi*.

#	Edad	Raza	Sexo	Caracterización	Valor S	Valor L	VHS	Valor de Referencia (vertebras)	Análisis
1	1-2	Cocker	Macho	Agudo	5.3	6.0	11.3	11 ± 0.8	Normal
2	3-5	Criollo	Macho	Agudo	4.2	5.0	9.2	9.5 ± 0.8	Normal
3	1-2	Pinscher	Hembra	Agudo	5.0	5.2	10.2	10.5 ± 0.6	Normal
4	1-2	Labrador	Hembra	Agudo	5.0	6.2	11.2	10.8 ± 0.6	Normal
5	5-10	Labrador Bull Terrier	Hembra	Agudo	5.0	6.1	11.1	10.8 ± 0.6	Normal
6	3-5		Macho	Crónico	5.8	6.3	12.1	11.7 ± 1.4	Normal
7	0.6	Criollo Golden	Macho	Crónico	3.9	5.2	9.1	9.5 ± 0.8	Normal
8	1-2	Retriever Golden	Hembra	Crónico	4.9	5.2	10.1	10.2 ± 0.5	Normal
9	5-10	Retriever Dogo	Hembra	Crónico	5.0	5.3	10.3	10.2 ± 0.5	Normal
10	1-2	Argentino	Hembra	Crónico	4.6	5.3	9.9	10 ± 0.6	Normal

Nota: Valor L = eje longitudinal cardiaco, Valor S = máximo eje perpendicular al longitudinal en el tercio medio, VHS: índice vertebral cardiaco.

(Fuente: archivo personal)

8. DISCUSIÓN

En Colombia, la expansión de la frontera agrícola, los cambios en la temperatura, la humedad y las estaciones de lluvia pueden alterar potencialmente la transmisión de *T. cruzi*, conduciendo a nuevos escenarios de transmisión, que favorecen la aparición de brotes (Cordovez y Sanabria, 2014). Ante este escenario, la implementación de medidas de prevención y control para la enfermedad de Chagas, son necesarios para reducir la tendencia hacia más brotes en áreas endémicas (Jaimes-Dueñez et al., 2017; Cantillo-Barraza et al., 2020). En este trabajo llevamos a cabo una vigilancia epidemiológica de la infección por *T. cruzi* en perros del AMB, donde anteriormente se han notificado brotes de la enfermedad de Chagas (Díaz et al., 2015). Se observó una alta seroprevalencia y áreas con circulación activa del parásito en todos los municipios, lo que sugiere una transmisión activa de este agente infeccioso en áreas urbanas de estos municipios. También identificamos variables epidemiológicas asociadas a la infección. Finalmente, alteraciones hematológicas de tipo anémico fueron observadas en los animales positivos a la infección de *T. cruzi*, lo que sugiere un efecto perjudicial del parásito sobre la salud de estos hospederos.

Para el caso de la seroprevalencia, los valores aquí obtenidos parecen ser mayores que los detectados en los departamentos de Boyacá, Magdalena y Meta (10,7% - 25,6%), donde tasas significativas de infestación por *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius prolixus*, *R. pictipes*, *R. pallescens*, y *T. dimidiata* han sido detectadas (Turriago et al., 2008; Vásquez et al., 2013; Jaimes-Dueñez et al., 2017), pero menor a la seroprevalencia detectada en áreas rurales de Cundinamarca (29,5%) y Bolívar (70,1%), donde altas tasas de infestaciones por *R. prolixus*, *R. colombiensis*, y *P. geniculatus*, han sido reportadas (Cantillo-Barraza et al., 2015; MesaArciniegas et al., 2018). Teniendo en cuenta que las tasas de infección por *T. cruzi* en perros están moduladas principalmente por la dinámica de las poblaciones de insectos vectores (Gürtler et al., 1996), la alta seroprevalencia de *T. cruzi* aquí observada, junto a la falta de una estructura espacial en la prevalencia de infección, podría explicarse debido a las altas tasas de infestación de triatominos invasores, como *P. geniculatus*, *R. pallescens*, y *T. dimidiata* infectados con *T. cruzi* en zonas de bosque, áreas peridomiciliarias, y ambientes recreativos, como lo fue demostrado en estos municipios por otros autores (Flórez, 2010; Reyes et al., 2017). Curiosamente, los perros de hogares donde los propietarios informaron haber notado insectos tenían una mayor prevalencia de infección (40.3%) que los que vivían en hogares donde los

propietarios no notaron estos insectos (23.9%), indicando un efecto directo de la infestación doméstica por triatominos en la prevalencia de infección por *T. cruzi* en caninos de la zona. De otro lado, la menor seropositividad detectada mediante la prueba de HAI, comparado con las pruebas de IFI y ELISA pone en evidencia la baja especificidad de las pruebas caseras y su posible relación cruzada con otros flagelados como *Trypanosoma evansi* y *Leishmania* sp., presentes en la zona (Ramirez A., 2020).

Aunque se han reportado frecuentes brotes de la enfermedad de Chagas en el AMB, se sabe poco sobre los factores epidemiológicos asociados con la infección de *T. cruzi* en esta área geográfica. En este estudio, observamos que el nivel socioeconómico y la recolección de desechos fueron importantes variables epidemiológicas asociadas con la prevalencia de infección por *T. cruzi* en perros (Figura 3), lo que sugiere que los animales que viven en sectores de un nivel socioeconómico más bajo (estrato uno) donde la recolección de desechos es deficiente, los caninos tienen un mayor riesgo de infección. Esto puede estar asociado con la proliferación de mamíferos sinantrópicos infectados naturalmente con *T. cruzi*. Otra característica que puede explicar la alta prevalencia de infección de *T. cruzi* en estas áreas, es el tipo de material empleado para construir las paredes de las casas. En este caso, observamos que los perros mantenidos en hogares con paredes de barro o madera tenían una seroprevalencia notablemente más alta que los perros mantenidos en hogares con paredes de concreto, lo que sugiere que las casas hechas con paredes de barro o madera son más propicias para la infestación por triatominos, lo que aumenta el riesgo de infecciones por *T. cruzi*.

Según estudios epidemiológicos en Argentina y Brasil, la vigilancia de animales domésticos puede y debe utilizarse como primera medida para identificar áreas con un riesgo elevado de infección por *T. cruzi* hacia los humanos (Xavier et al., 2012). Por lo tanto, los ciudadanos del AMB que viven en sectores que presentan las características anteriormente mencionadas, pueden tener un mayor riesgo de infección que las personas que viven en sectores socioeconómicos más altos. Curiosamente, el último brote de la enfermedad de Chagas en el AMB se registró en un barrio de nivel socioeconómico uno, donde el acceso al saneamiento básico aún es limitado (SETIC, 2017), sugiriendo que los servicios públicos en estos sectores deberían mejorarse para prevenir brotes de enfermedad de Chagas. Aunque en el AMB los brotes de enfermedad de Chagas se han asociado principalmente con la transmisión oral (Ej: cuando se consumen frutas o jugos contaminados), la cual no representa un riesgo importante de infección para los caninos, la vigilancia de la seroprevalencia de la infección en perros nos permite identificar áreas

con mayor riesgo de transmisión a los humanos. Esto significa que la existencia de diferentes rutas en la transmisión de *T. cruzi* no reduce la relevancia de utilizar los caninos como animales centinelas para establecer el riesgo de infección hacia la población humana.

En cuanto a las tasas de infección activa de *T. cruzi*, los valores aquí observados son superiores a los reportados en perros de áreas enzoóticas de los departamentos de Bolívar, Boyacá y Meta (0.0% - 2,1%) (Turriago et al., 2008; Cantillo-Barraza et al., 2015; Jaimes-Dueñez et al., 2017). La alta tasa de infección activa de *T. cruzi* en perros del AMB, sumado a la alta seroprevalencia y parasitemia activa en cachorros sugieren una exposición continua de estos hospederos al parásito y destaca la importancia de estos animales en el ciclo de transmisión de *T. cruzi* en áreas urbanas. Por otro lado, aunque la PCR parece ser un método eficiente para la detección de ADN de *T. cruzi*, ha mostrado una sensibilidad limitada en pacientes con parasitemia muy baja o intermitente. Hasta donde sabemos, esta es el primer estudio molecular de *T. cruzi* en perros usando el ensayo nPCR descrito por Marcon y col. (2002), el cual tiene una buena especificidad y sensibilidad, y se ha recomendado para la detección de ADN de *T. cruzi* en pacientes con infecciones crónicas y serología no concluyente (Batista et al., 2010). Estas características también pueden explicar la alta tasa de infección activa aquí detectada, y sugiere que futuras vigilancias moleculares de *T. cruzi* en perros deben considerar el uso de esta prueba para la detección de ADN de *T. cruzi* en casos subclínicos con microscopía negativa. De igual manera, el uso de esta prueba en animales seronegativos del AMB sería una importante herramienta para obtener una comprensión más completa de la dinámica de la infección por *T. cruzi* en estos hospederos. De otro lado la baja proporción de animales positivos mediante métodos moleculares comparado con los métodos serológicos, pone en evidencia la importancia del perro como un hospedero centinela de la infección por *T. cruzi* mas no como un reservorio relevante de este parasito en el AMB; dicho fenómeno podría sugerir una mayor respuesta inmunológica de los caninos hacia el DTU I (aquí observado), así como una mayor susceptibilidad de este genotipo al sistema inmune de estos hospederos. No obstante, futuros estudios son necesarios para confirmar estas hipótesis.

En Colombia, la prevalencia de la infección por *T. cruzi* en perros ha sido reportada en al menos cinco departamentos. Sin embargo, las características clínicas asociadas con esta infección aún no se han evaluado (Turriago et al., 2008; Cantillo-

Barraza et al., 2015; Jaimes-Dueñez et al., 2017). Curiosamente, la vigilancia epidemiológica aquí realizada, encontró anomalías hematológicas asociadas con la infección natural de *T. cruzi*. En nuestro caso, los animales con parasitemia activa mostraron una disminución del RGR con aumento del VCM y CHCM, lo que sugiere una anemia de tipo regenerativo, mientras que los animales seropositivos sin parasitemia activa mostraron concentraciones bajas de hemoglobina y plaquetas, lo que sugiere anemia crónica acompañada de trombocitopenia (Tabla 3, Figura 3). Estos resultados se parecen a los observados durante las infecciones experimentales en perros con la cepa ABC de *T. cruzi*, pero difiere de los observados con la cepa Col, lo que indica que las alteraciones hematológicas en estos hospederos pueden estar moduladas por el tipo de cepa (Guedes et al., 2012; Duz et al., 2014). Los estudios experimentales en otros modelos biológicos mostraron que, durante la fase aguda, los antígenos producidos por *T. cruzi* (Ej: *Transsialidasa* y *Neuraminidasa*) induce la lisis de los eritrocitos y acelera el aclaramiento de las plaquetas, lo que conduce a la trombocitopenia observada durante la infección aguda (Tribulatti et al., 2005; Aminu et al., 2017). Además, otras moléculas derivadas de la respuesta inmune durante la infección, como citocinas, quimiocinas, anticuerpos, óxido nítrico y otros marcadores inflamatorios, también pueden contribuir a producir alteraciones en los parámetros hematológicos (Tribulatti et al., 2005). De la misma forma, la anemia en la fase crónica no está estrictamente asociada a la presencia del parásito en la sangre, sino que es consecuencia del agotamiento de las células madre pluripotenciales de la médula ósea, debido a ataques constantes por oleadas de parasitemia (Nwoha, 2013). Finalmente, aunque la tasa de coinfección de *T. cruzi* con otros agentes hemotrópicos (*Hepatozoon* spp., *Dirofilaria* spp., y *Ehrlichia* spp.) fue inferior al 1%, la falta de detección basada en ADN de estos géneros pudo haber generado un subdiagnóstico de estas coinfecciones, por lo que los signos clínicos observados, no pueden ser del todo asociadas a la infección por *T. cruzi*. De igual manera otros factores como la mala nutrición y presencia de ectoparásitos (garrapatas, pulgas, piojos), también pueden explicar la anemia observada en los animales positivos de los estratos uno y dos. Futuros estudios que involucren el diagnóstico molecular de otros agentes patógenos que puedan producir anemia y alteraciones plaquetarias son necesarios para confirmar los signos clínicos observados en los animales positivos a *T. cruzi*.

De otro lado, estudios clínicos en cachorros de Estados Unidos y América Latina encontraron que los pseudoquistes de *T. cruzi* dentro de los cardiomiocitos producen una respuesta inflamatoria, que resulta en arritmias, dilatación de la cámara cardíaca y

disfunción sistólica, que involucra la actividad sérica de las isoenzimas AST y CK (Barr y col., 1991; Vitt et al., 2016; Almeida et al., 2013). Curiosamente, tanto los niveles de AST y CK-MB, al igual que los valores del índice vertebral cardiaco, no se encontraron aumentados en los perros infectados con *T. cruzi*, lo que sugiere que las cepas encontradas en el AMB, al parecer no producen un daño significativo en el miocardio de estos hospederos. No obstante, es posible que otros aspectos como la transferencia de inmunidad pasiva de la madre al cachorro, las bajas dosis infectivas, y el componente genético de los animales, también pueden explicar la falta de signos clínicos asociados a la infección por este hemoparásito en esta población canina. Finalmente, la mayor frecuencia de parasitemia activa de *Dirofilaria* sp., en el grupo de animales seronegativos comparado con los animales seropositivos puede explicar los altos niveles de AST y CK en este primer grupo debido a los daños cardiacos ocasionados por las especies de este género (Carreton et al. 2012).

9. CONCLUSIONES

- La vigilancia serológica y molecular de la infección por *T. cruzi* en perros del AMB, determinó características sociodemográficas asociadas a la infección por este hemoparásito, lo cual es de gran importancia a la hora de establecer medidas de vigilancia y control para la enfermedad de Chagas en estos municipios.
- Las personas que habitan en viviendas de los estratos socioeconómicos uno y dos del AMB, presentan un mayor riesgo de infección con *T. cruzi*; por tal motivo, las estrategias de vigilancia y control de la enfermedad de Chagas, deberían priorizarse en estas localidades.
- La vigilancia molecular de *T. cruzi* empleando la técnica de nPCR descrita por Marcon et al., 2002, permitió detectar casos de infección activa en perros del AMB, que demuestran la importancia de los caninos en el ciclo de transmisión doméstico de este parásito.
- Los análisis del cuadro hemático sugieren que la infección natural por *T. cruzi* en perros del AMB, produce una anemia de tipo regenerativo durante la infección aguda, y una anemia no regenerativa durante la infección crónica.
- Los resultados de la AST, CK, y el índice vertebral cardiaco, sugieren que la infección natural por *T. cruzi* en perros del AMB, no produce daños significativos en el miocardio de estos animales, probablemente asociado al tipo de cepa del parásito.

10. RECOMENDACIONES

- Futuros estudios moleculares que evalúen la coinfección con otros agentes hemotrópicos en estos hospederos, son necesarios para establecer si las alteraciones hematológicas aquí observadas, corresponden a daños patológicos ocasionados por *T. cruzi*.
- Con base en los resultados del presente estudio, todo canino proveniente de los estratos socioeconómicos bajos del AMB, con signos clínicos de anemia y trombocitopenia, debería considerarse un riesgo de infección zoonótico por *T. cruzi*. Por tal motivo, los propietarios, veterinarios y tenedores de mascotas, deberán manipular estos animales con las respectivas medidas de bioseguridad.

11. PRODUCTOS OBTENIDOS

11.1 Presentación en congresos y eventos académicos

- Ponente en el encuentro de jóvenes investigadores Claude Véricel de la Universidad Cooperativa de Colombia. 2019. Certificado # 1.
- Ponente poster en el evento XVII congreso colombiano de medicina y parasitología tropical. 2019. Certificado # 2.

11.2 Artículos publicados

- Epidemiological and clinical characteristics of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs (*Canis lupus familiaris*) from a Chagas Disease-Endemic Urban Area in Colombia. Preventive Veterinary Medicine 182 (2020) 105093. Certificado # 3.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, A.D., de Paula, D.A., Otton, M., Jaune, F., da Cruz, R., Madeira, M., Nakazato, L., Mendonça, A., Pescador, C., 2013. Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in one dog in central western Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 55, 1678–9946.
- Aminu, R., Ibrahim, M.A., Rahman, M.A., Dash, R., Umar, I.A., 2017. Trypanosuppressive effects of ellagic acid and amelioration of the trypanosome-associated pathological features coupled with inhibitory effects on trypanosomal sialidase in vitro and in silico. Phytomedicine 30, 67–73.
- Antinori S, Galimberti L, Bianco R, Grande R, Galli M, Corbellino M. 2017. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. Eur J Intern Med, 43:6-15.
- Batista, A.M., Aguiar, C., Almeida, E., Guariento, M.E., Wanderley, J.S., Costa, S.C., 2010. Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megaesophagus. Int. J. Infect. Dis. 14, e974–7.
- Barr, S.C., Gossett, K.A., Klei, T.R., 1991. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observations of trypanosomiasis in dogs infected with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. Am. J. Vet. Res. 52, 954–960.
- Bavegems V, Van Caelenberg A, Duchateau L, Sys SU, Van Bree H, De Rick A. 2005. Vertebral heart size ranges specific for whippets. Vet Radiol Ultrasound. Sep-Oct;46(5):400-3. doi: 10.1111/j.1740-8261.2005.00073.x. PMID: 16250398.
- Bezerra, C.M., Cavalcanti, L.P., Souza, R., Barbosa, S.E., Xavier, S.C., Jansen, A.M., Ramalho, R.D., Diotaiuti, L., 2014. Domestic, peridomestic and wild hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Caatinga area colonised by *Triatoma brasiliensis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 109, 887–898.
- Boakye, D., Tang, J., Truc, P., Merriweather, A., Unnasch, T.R., 1999. Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. Med. Vet. Entomol. 13, 282–287.

- Buchanan JW. Vertebral scale system to measure heart size in radiographs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2000 Mar;30(2):379-93, vii. PMID: 10768239.
- Cantillo-Barraza, O., Garcés, E., Gómez-Palacio, A., Cortés, L.A., Pereira, A., Marcet, P., Jansen, A., Triana-Chávez, O., 2015. 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* 8, 482.
- Cantillo-Barraza, O., Medina, M., Zuluaga, S., Valverde, C., Motta, C., Ladino, A., Osorio, M.I., Jaimes-Dueñez, J., Triana-Chávez, O., 2020. Eco-epidemiological study reveals the importance of *Triatoma dimidiata* in the *Trypanosoma cruzi* transmission, in a municipality certified without transmission by *Rhodnius prolixus* in Colombia. *Acta Trop.* 209, 105550.
- Cantillo-Barraza, O, Gómez-Palacio A, Salazar D, Mejía-Jaramillo AM, Calle J, Triana O. 2010. Distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en la Isla Margarita del departamento de Bolívar, Colombia. *Biomédica.*
- Cardinal MV, Castañera MB, Lauricella MA, Cecere MC, Ceballos LA, Vazquez-Prokopec GM, et al. 2006. A prospective study of the effects of sustained vector surveillance following community-wide insecticide application on *Trypanosoma cruzi* infection of dogs and cats in rural Northwestern Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 75(4):753-61.
- E. Carretón, G. Grandi, R. Morchón, F. Simón, B. Passeri, A.M. Cantoni, L. Kramer, J.A. Montoya-Alonso. 2012. Myocardial damage in dogs affected by heartworm disease (*Dirofilaria immitis*): Immunohistochemical study of cardiac myoglobin and troponin I in naturally infected dogs, *Veterinary Parasitology* Volume 189, Issues 2–4, Pages 390-393.
- Cordovez, J.M., Sanabria, 2014. Environmental changes can produce shifts in chagas disease infection risk. *Environ. Health Insights* 8, 43–48.

- Crisante G, Rojas A, Teixeira MM, Añez N. 2006, Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Trop.* 98(3):247-54.
- Crisante, G., Rojas, A., Teixeira, M.M., Añez, N., 2006. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Trop.* 98, 247–254.
- Curtis-Robles, R., Snowden, K.F., Dominguez, B., Dinges, L., Rodgers, S., Mays, G., Gürtler, R.E., 2017. Epidemiology and molecular typing of *Trypanosoma cruzi* in naturally-infected hound dogs and associated triatomine vectors in Texas, USA. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (1), e0005298.
- Díaz ML, Leal S, Mantilla JC, Molina-Berríos A, López-Muñoz R, Solari A, et al. 2015. Acute Chagas outbreaks: molecular and biological features of *Trypanosoma cruzi* isolates, and clinical aspects of acute cases in Santander, Colombia. *Parasit Vectors.* 8:608. Epub 2015/11/26. doi: 10.1186/s13071-015-1218-2. PubMed PMID: 26612724; PubMed Central PMCID:PMCPMC4661967.
- Díaz, M.L., Leal, S., Mantilla, J.C., Molina-Berríos, A., López-Muñoz, R., Solari, A., Escobar, P., González, C.I., 2015. Acute Chagas outbreaks: molecular and biological features of *Trypanosoma cruzi* isolates, and clinical aspects of acute cases in Santander, Colombia. *Parasit. Vectors* 8, 608.
- Duz, A.L., Vieira, P.M., Roatt, B.M., Aguiar-Soares, R.D., Cardoso, J.M., Oliveira, F.C., Reis, L.E., Tafuri, W.L., Veloso, V.M., Reis, A.B., Carneiro, C.M., 2014. The TcI and TcII *Trypanosoma cruzi* experimental infections induce distinct immune responses and cardiac fibrosis in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 1005–1013.
- Eloy, L.J., Lucheis, S.B., 2009. Canine trypanosomiasis: etiology of infection and implications for public health. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 15, 589–611.
- Estrada-Franco, J.G., Bhatia, V., Diaz-Albiter, H., Ochoa-Garcia, L., Barbabosa, A., Vazquez-Chagoyan, J., Martinez-Perez, M., Guzman-Bracho, C., Garg, N.,

2006. Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 624–630.
- Farnsworth, 2017. *The Colombia Reader: History, Culture, Politics*, First ed. Duke University Press, Durham, North Carolina.
 - Flórez, M.M., 2010. Distribución espacial de poblaciones de *Triatoma dimidiata* y *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) en Santander, Colombia. *Noesis*. pp. 1–100.
 - Guedes, P.M., Veloso, V.M., Mineo, T.W., Santiago-Silva, J., Crepalde, G., Caldas, I.S., Nascimento, M.S., Lana, M., Chiari, E., Galvão, L.M., Bahia, M.T., 2012. Hematological alterations during experimental canine infection by *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 151–156.
 - Guhl F AG, Pinto N, Vergara D. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. *Biomedica*; 2007. p. 143-62.
 - Gurtler, R.E., Cecere, M.C., Castanera, M.B., Canale, D., Lauricella, M.A., Chuit, R., Cohen, J.E., Segura, E.L., 1996. Probability of infection with *Trypanosoma cruzi* of the vector *Triatoma infestans* fed on infected humans and dogs in northwest Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 24–31.
 - Gürtler, R.E., Cécere, M.C., Petersen, R.M., Rubel, D.N., Schweigmann, N.J., 1993. Chagas disease in north-west Argentina: association between *Trypanosoma cruzi* parasitaemia in dogs and cats and infection rates in domestic *Triatoma infestans*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 12–15.
 - Hernández C, Salazar C, Brochero H, Teherán A, Buitrago LS, Vera M, et al. 2016a. Untangling the transmission dynamics of primary and secondary vectors of *Trypanosoma cruzi* in Colombia: parasite infection, feeding sources and discrete typing units. *Parasit Vectors*. 9(1):620.
 - Hernández C, Vera MJ, Cucunubá Z, Flórez C, Cantillo O, Buitrago LS, et al. 2016b. High-Resolution Molecular Typing of *Trypanosoma cruzi* in 2 Large Outbreaks of Acute Chagas Disease in Colombia. *J Infect Dis.* 214(8):1252-5.

- INS. 2017. Semana epidemiológica número 31 de 2017 - Santander. Instituto Nacional de Salud.
- Jaimes-Dueñez J, Triana O, Valencia A, Sánchez D, Poche A, Ortíz J, et al. 2017. Molecular diagnosis and phylogeographic analysis of *Trypanosoma evansi* in dogs (Canis lupus familiaris) suggest an epidemiological importance of this species in Colombia. Preventive Veterinary Medicine. 82-9.
- Jepsen-Grant K, Pollard RE, Johnson LR. Vertebral heart scores in eight dog breeds. Vet Radiol Ultrasound. 2013 Jan-Feb;54(1):3-8. doi: 10.1111/j.1740-8261.2012.01976.x. Epub 2012 Sep 21. PMID: 22994206.
- Llau, A.F., Tejada, C.E., Ahmed, N.U., 2019. Chagas disease prevalence in Colombia: a meta-analysis and systematic review. Vector Borne Zoonotic Dis. 19, 81–89. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2308>.
- Luciani MG, Withoef JA, Mondardo Cardoso Pissetti H, Pasini de Souza L, Silvestre Sombrio M, Bach EC, Mai W, Müller TR. Vertebral heart size in healthy Australian cattle dog. Anat Histol Embryol. 2019 May;48(3):264-267. doi: 10.1111/ahel.12434. Epub 2019 Feb 17. PMID: 30772943.
- Malafia G, Rodrigues AS. 2010. [Centenary of the discovery of Chagas disease: challenges and prospects]. Rev Soc Bras Med Trop. 43(5):483-5. PubMed PMID: 21085853.
- Marcon, G.E., Andrade, P.D., de Albuquerque, D.M., Wanderley, J.S., de Almeida, E.A., Guariento, M.E., Costa, S.C., 2002. Use of a nested polymerase chain reaction (NPCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 43, 39–43.
- Mesa-Arciniegas, P., Parra-Henao, G., Carrión-Bonifacio, Á., Casas-Cruz, A., Patiño-Cuellar, A., Díaz-Rodríguez, K., Garzón-Jiménez, S., Almansa-Manrique, J., Bernal-Rosas, Y., Hernández-Lamus, C., Pedraza-Toscano, A., Torres-García, O., 2018. *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs from an endemic region of Cundinamarca, Colombia. Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep. 14, 212–216.

- Moser, D.R., Kirchhoff, L.V., Donelson, J.E., 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1477–1482.
- Nwoha, R., 2013. A review on trypanosomosis in dogs and cats. *Afr. J. Biotechnol.* 12, 6432–6442. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.12093>.
- OPS. 2014. Departamento de Enfermedades Transmisibles y Análisis de Salud Unidad de Enfermedades Desatendidas, Tropicales y Transmitidas por Vectores Programa de Enfermedad de Chagas. Organización Panamericana de la Salud.
- OPS/OMS, 2019. Chagas Diseases. (Accessed 09 March 2020). <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>.
- Orozco, M.M., Enriquez, G.F., Alvarado-Otegui, J.A., Cardinal, M.V., Schijman, A.G., Kitron, U., Gürtler, R.E., 2013. New sylvatic hosts of *Trypanosoma cruzi* and their reservoir competence in the humid Chaco of Argentina: a longitudinal study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88, 872–882.
- Pereira KS, Schmidt FL, Barbosa RL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, et al. 2010. Transmission of chagas disease (American trypanosomiasis) by food. *Adv Food Nutr Res.* 59:63-85.
- Ramírez, J.D., Tapia-Calle, G., Guhl, F., 2013. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* in Colombia revealed by a high-throughput nuclear multilocus sequence typing (nMLST) approach. *BMC Genet.* 14, 96.
- Ramirez A., 2020. Reporte de caso, leishmaniasis en paciente canino (*Canis lupus familiaris*) de la raza pug en la clínica veterinaria animales de compañía de la Universidad Cooperativa de Colombia. Repositorio UCC .
- Reyes M, Torres A, Esteban L, Flórez M, Angulo V. 2017. Riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas por intrusión de triatomíneos y mamíferos silvestres en Bucaramanga, Santander, Colombia *Biomédica.* 67-78.

- Rueda, K., Trujillo, J.E., Carranza, J.C., Vallejo, G.A., 2014. Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *Biomedica* 34, 631–641.
- Santander Gd. Casos de Chagas agudo en Piedecuesta: Secretaría de Salud, Gobernación de Santander; 2018. Available from: <http://www.santander.gov.co/index.php/actualidad/item/1734-brote-de-chagas-agudo>.
- SETIC, 2017. Casos de Chagas Agudo en Piedecuesta. Secretaría de las Tecnologías de la Información y Comunicación – SETIC de la Gobernación de Santander. (Accessed 09 March 2020). <http://www.santander.gov.co/index.php/actualidad/item/1734-brote-de-chagas-agudo>.
- Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A., Zingales, B., 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 141–152. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(96\)02755-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02755-7).
- Telleria J, Tibayrenc M. 2017. *American Trypanosomiasis Chagas Disease*. Montpellier, France: © Academic Press.
- Tribulatti, M.V., Mucci, J., Van Rooijen, N., Leguizamón, M.S., Campetella, O., 2005. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents. *Infect. Immun.* 73, 201–207. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.201-207.2005>.
- Turriago, G.B., Vallejo, G.A., Guhl, F., 2008. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* indogs from two endemic areas of Colombia. *Rev. Fac. Med.* 16, 11–18 ISSN 0121-5256.
- Vásquez, C.S., Calle, J., Triana, O., 2013. Identificación de nuevos escenarios epidemiológicos para la enfermedad de Chagas en la región momposina, norte de Colombia. *Biomedica* 33.

- Vitt, J.P., Saunders, A.B., O'Brien, M.T., Mansell, J., Ajithdoss, D.K., Hamer, S.A., 2016. Diagnostic features of acute chagas myocarditis with sudden death in a family of boxer dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 30, 1210–1215. <https://doi.org/10.1111/jvim.13967>.
- Villa, L.M., Guhl, F., Zabala, D., Ramírez, J.D., Urrea, D.A., Hernández, D.C., Cucunubá, Z., Montilla, M., Carranza, J.C., Rueda, K., Trujillo, J.E., Vallejo, G.A., 2013. The identification of two *Trypanosoma cruzi* I genotypes from domestic and sylvatic transmission cycles in Colombia based on a single polymerase chain reaction amplification of the spliced-leader intergenic region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 932–935.
- WHO. 2007. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases & Pan American Health Organization. Buenos Aires, Argentina. Geneva: World Health Organization. 2007.
- Xavier SC, Roque AL, Lima VoS, Monteiro KJ, Otaviano JC, Ferreira da Silva LF, et al. 2012. Lower richness of small wild mammal species and chagas disease risk. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(5): e1647.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 12(2):240-53.

13. CERTIFICADOS

- Certificado # 1.



**UNIVERSIDAD
COOPERATIVA
DE COLOMBIA**

LA UNIVERSIDAD COOPERATIVA DE COLOMBIA

Certifica que:

Lucas Andrés Moreno Salcedo

Participó en calidad de ponente en el Encuentro Claude Vericel de Jóvenes Investigadores en Ciencias Pecuarias 2019 - II desarrollado el 22 de noviembre de 2019.



César Augusto Serrano Novoa
Director

Vigilada Mineducación

- Certificado # 2.



**XVII Congreso Colombiano de
Parasitología y Medicina Tropical**
En busca de la eliminación de eventos transmisibles

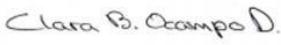


Certifica que:

Lucas Andrés Moreno Salcedo

Participó en calidad de *Ponente poster* en el evento:

XVII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical
Que se realizó en la ciudad de Santiago de Cali,
del 4 al 6 de diciembre de 2019



Clara B. Ocampo D.
Clara B. Ocampo, MSc, PhD
Presidente



Juan David Ramírez González, PhD
Vicepresidente

- Certificado # 3.



Epidemiological and clinical characteristics of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs (*Canis lupus familiaris*) from a Chagas Disease-Endemic Urban Area in Colombia



Jeiczon Jaimes-Dueñez^{a,b,*}, Ángela Patricia Jiménez-Leaño^a, Maria Esteban-Mendoza^a, Lucas Andres Moreno-Salcedo^a, Omar Triana-Chávez^b, Omar Cantillo-Barraza^b

^a Grupo de Investigación en Ciencias Animales GRICA, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Cooperativa de Colombia UCC, Bucaramanga, Colombia

^b Grupo Biología y Control de Enfermedades Infecciosas-BCEI, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:
Zoonotic
Prevalence
Mammals
Reservoir
Bucaramanga
Santander

ABSTRACT

In the last few years, an unusual increase in the number of acute Chagas disease outbreaks, presumably due to oral transmission, has been reported in urban areas in Santander, Colombia. Given the importance of dogs (*Canis lupus familiaris*) as reservoir hosts and sentinels of *T. cruzi* infection across different regions of America, we carried out a serological and molecular survey on *T. cruzi* infection in 215 dogs from the metropolitan area of Bucaramanga, Santander. Serological detection was carried out using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescence antibody test (IFAT), and indirect hemagglutination assay (IHA), while molecular detection was done using a nested PCR (nPCR), targeting the microsatellite region of *T. cruzi* nuclear DNA. Animals were defined as seropositive when at least two of the three serological tests were positive, and only these animals were evaluated with the nPCR. To discriminate DTU TcI from other DTUs, a multiplex PCR was performed in the *T. cruzi*-positive samples. Additionally, clinical and hematological traits were evaluated in these hosts. The dog sera showed a seropositivity rate of 27.9 % (60/215), of which 43.3 % (26/60) were positive for nPCR. Statistical analysis indicated that *T. cruzi* seropositive in dogs was associated with specific socioeconomic sectors and a lack of garbage collection in these municipalities. Hematological analyses showed that *T. cruzi* infection was associated with anemia and platelet alterations but not with alterations of aspartate aminotransferase (ASAT) and creatine kinase myocardial band (CK-MB). The high seroprevalence of infection and active circulation of *T. cruzi* I (TcI) in dogs reflect the risk of infection to humans in this area, which should be taken into consideration when Chagas disease control programs are implemented. In addition, *T. cruzi* infection may take a toll on dog health, which should be considered during dog care and management.

1. Introduction

Chagas disease (CD) is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. This disease affects more than 6 million people and results in approximately 12,000 deaths annually in Latin America (PAHO/WHO, 2019). *T. cruzi* has a high genetic variability with evidence of six Discrete Typing Units (DTU's I-VI), adapted to several mammalian species in diverse ecological niches (Zingales et al., 2012). It is transmitted through contact with feces/urine of infected blood-sucking triatomine bugs (vector-borne transmission) or by blood transfusion, oral ingestion, laboratory accidents, organ transplantation, and/or vertical transmission (Orozco et al., 2013; Bezerra et al., 2014;

PAHO/WHO, 2019).

In the last decade, an increase in acute outbreaks of CD of presumptive oral transmission has been reported in different areas in Colombia (Rueda et al., 2014; Llau et al., 2019). The investigation of the outbreak in the metropolitan area of Bucaramanga (MAB), in Santander department, which produced approximately 30 acute cases of CD with mortality rates of up to 10 %, led to the conclusion that the intensive environmental changes (such as urbanization expansion, deforestation and increase of generalist species) that have taken place in this region increased the likelihood of outbreaks (Díaz et al., 2015). Given the lack of knowledge about the transmission dynamics of *T. cruzi* in this area and the role of wild and domestic mammalian reservoir

* Corresponding author at: Grupo de Investigación en Ciencias Animales, Universidad Cooperativa de Colombia, Calle 30 No. 33-51, Bucaramanga, Santander, Colombia.

E-mail address: jeiczon05@gmail.com (J. Jaimes-Dueñez).

<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105093>

Received 26 March 2020; Received in revised form 10 July 2020; Accepted 10 July 2020
0167-5877/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.