

Enfermedad de Chagas en caninos de zonas de alta endemia de la provincia de Salta

Javier Binda¹, Gabriela Trova¹, Marcelo Alonso¹, Marcelo Farías¹,
Olga Sánchez Negrette¹

Resumen

La Enfermedad de Chagas se produce por la infección con el parásito *Trypanosoma cruzi*, cuyo principal vector en la Argentina, es el *Triatoma infestans* (vinchuca). Se reconocen tres ciclos: doméstico, peridoméstico y selvático. El perro, constituye un nexo entre los tres ciclos.

Objetivos: conocer la seroprevalencia positiva para enfermedad de Chagas en caninos en Departamentos de Salta, altamente endémicos.

Metodología: hemos realizado 3 viajes a zonas de alta endemia. El primero fue a localidades de Rivadavia Banda Sur, el segundo fue a San Carlos y Animaná (zonas rurales) y el tercero a la localidad Cafayate. Previa aceptación del dueño o cuidador del can, se obtuvo 3-5 ml de sangre por punción venosa de la cefálica antebraquial, luego se obtuvo suero y se conservó a -20 °C hasta su uso.

Se realizaron análisis serológicos de *screening*, por el método Hemaglutinación Indirecta (Chagatest-HAI- Wiener); y confirmatorios por el método de Ezimoinmunoanálisis (Wiener-Chagatest ELISA y Sigma-Aldrich).

Resultados

Parajes de Rivadavia: se muestrearon 22 perros 4.5% positivo (1/22).

San Carlos: 39 perros, detectándose 30,80% (12/39) de seropositivos.

Cafayate: 66 perros, 1.51% (1/66 seropositivos).

Discusión: varios autores consideran al perro como un «factor de riesgo» en la transmisión de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, se desconoce el desarrollo de la enfermedad en los canes y menos aún su cura.

Conclusión: podemos comprobar que el perro es un reservorio de la enfermedad de Chagas y depende de la edad del mismo puede actuar como centinela en etapas de vigilancia del vector. Consideramos importante poder tratar al perro, puesto que es un animal de trabajo en el ambiente rural.

Palabras clave: Chagas - *Trypanosoma cruzi* - caninos - Salta

¹ Carrera de Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, UCaSal.

Introducción

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una infección causada por el protozooario flagelado, el *Trypanosoma cruzi*. Está incluido en la sección stercorarios, junto con el grupo de tripanosomas, cuyos estados infectivos se desarrollan en el tracto digestivo del vector y contaminan los huéspedes mamíferos a través de las heces (WHO, 1991). Los huéspedes vertebrados son insectos hemípteros de la familia Reduviidae, siendo de importancia sanitaria en nuestro país el *Triatoma infestans* (vinchuca) (Pinto Días, 1992).

La Enfermedad de Chagas constituye una situación en donde confluyen factores socio-económicos y bio-ecológicos, permitiendo la domiciliación de insectos triatomíneos, vectores de la infección.

Se reconocen tres ciclos: doméstico, peridoméstico y selvático. Desde el punto de vista de salud pública, la importancia de la Enfermedad de Chagas está relacionada con el ciclo «doméstico», donde además de los humanos también intervienen los animales que conviven con él, principalmente perros y gatos (Who, 1991).

Los planes de control y vigilancia de la enfermedad de Chagas en el hombre y los animales consisten principalmente en fumigación de hogares y zonas peridomiciliarias, a fin de disminuir la infestación vectorial; luego se realiza el diagnóstico a las personas, con aplicación de tratamiento principalmente a los niños menores de 14 años (Schofield et al., 2006). La aplicación de estos planes de control en la Argentina comenzó en 1952, y ha logrado la interrupción de la transmisión vectorial en 4 de las 19 provincias endémicas del país. La provincia de Salta, se encuentra en el grupo de provincias con transmisión vectorial interrumpida pendiente de demostración o con transmisión vectorial focal (Zaidenberg et al., 2004). En las zonas rurales de la provincia de Salta, el

perro constituye un animal de guardia y trabajo, como por ejemplo los perros pastores.

En este contexto los caninos tienen gran importancia por ser uno de los principales reservorios de la enfermedad, agravado por la estrecha convivencia entre esta especie animal y el hombre. Está demostrado que cuando los caninos infectados permanecen en áreas donde duermen sus dueños, la tasa de infección en insectos es significativamente mayor que cuando no lo hacen (Gurtler et al., 1993). Además, los caninos fueron propuestos como centinelas de la transmisión en áreas infectadas (Castañera et al., 1995).

La enfermedad de Chagas no es de diagnóstico frecuente en los caninos, si bien es de reconocimiento mundial su importancia en la cadena epidemiológica, no se trata la enfermedad. Es decir que el animal enfermo es valorado como reservorio y no como paciente para el Médico Veterinario.

Objetivos

1. Conocer la seroprevalencia positiva para la Enfermedad de Chagas en caninos en departamentos de Salta altamente endémicos.
2. Estandarizar métodos de diagnóstico serológico para la infección por *T. cruzi* en caninos.

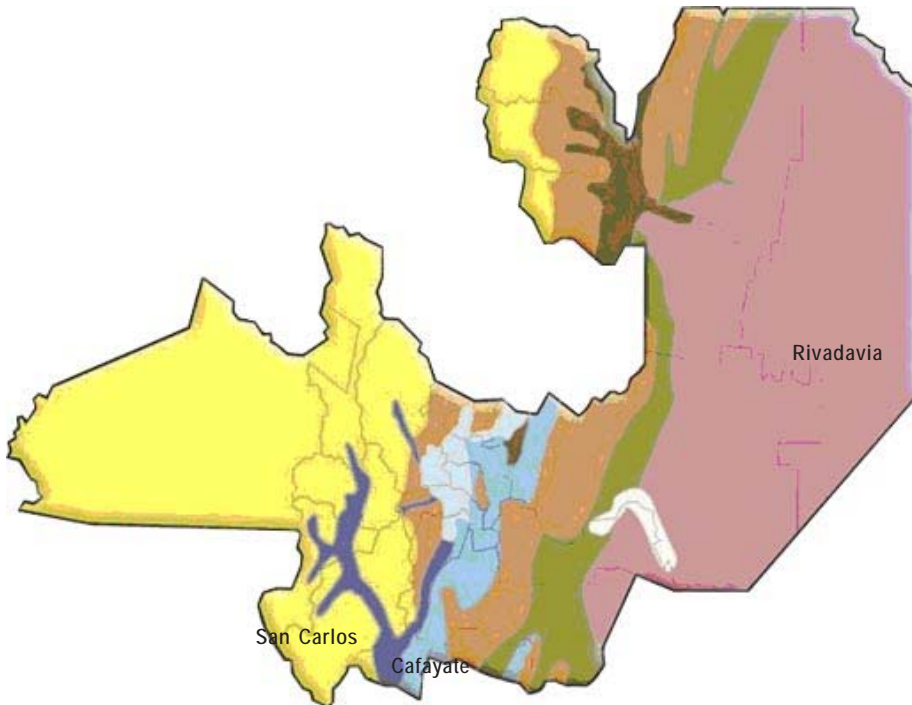
Metodología

Área de estudio

El estudio fue realizado en áreas endémicas del norte y sur de la provincia de Salta, las cuales se hallan en la etapa de vigilancia epidemiológica: departamentos de Rivadavia (Banda Sur), Latitud 24°11'049"S, Longitud 62°52'57.39"O, Altitud 210 m; San Carlos Latitud 25°55'53.73"S, Longitud 65°56'43.29"O, Altitud 1604 m y Cafayate, Latitud 26° 4.13.16"S,

longitud 65°58.43.4"O, Altitud 1620m. Las viviendas cuyos animales fueron muestreados presentan las construcciones típicas de las zonas rurales, con materiales como adobe, paja,

barro, características que propician las condiciones de vida para los vectores que, de hecho pudieron ser observados durante las visitas a los hogares.



Selección de individuos

El estudio se realizó sobre un total de 127 caninos distribuidos en las áreas antes mencionadas, durante el periodo comprendido entre mayo de 2010 y junio de 2011, con autorización y colaboración de los propietarios para la realización de la extracción. Los caninos pertenecían a viviendas con antecedentes de infestación domiciliaria y fumigaciones posteriores.

Toma de muestra de sangre

Para la toma de muestras de sangre de los canes, realizamos visitas domiciliarias donde se les solicitó autorización a los propietarios y se les explicó la importancia de conocer el estado de infección de su mascota.

Además se les preguntó sobre la presencia de triatomíneos en las viviendas y si recordaban la fecha del último rociado.

Las vinchucas encontradas se trajeron para analizarlas.

La toma de muestra propiamente dicha se realizó por venopunción cefálica antibraquial de caninos, extrayéndose entre 3 y 5 ml de sangre; dejándose retraer el coágulo, se obtuvo el suero de las mismas, conservándose a -20°C hasta su utilización en el procesamiento serológico.

Datos epidemiológicos

Se completaron fichas de cada animal, y se registró: nombre del paciente, edad, sexo.

Pruebas serológicas

- Para la detección de los anticuerpos anti-*T. cruzi*, se usaron las técnicas de Hemaglutinación Indirecta (HAI) y Enzimo-inmunoanálisis (ELISA).

La reacción de hemaglutinación indirecta (HAI) está basada en los trabajos de Boyden y col. y consiste en modificar la membrana de los hematíes por medio de Ácido Tánico. Los glóbulos así tratados se comportan como partículas inertes capaces de absorber los antígenos parasitarios. Se realiza enfrentando el suero del paciente con una suspensión de hematíes previamente sensibilizados con antígenos citoplasmáticos. Si en el suero del paciente existen anticuerpos anti *T. cruzi* éstos van a producir aglutinación específica. En el suero pueden existir anticuerpos inespecíficos (heterófilos) que pueden dar resultados falsos positivos, por lo que siempre se realizó prueba de heterofilia y eliminación de estos anticuerpos en los casos en que estuvieran (Konishi, 1993). Se realizan diluciones al medio del suero. Se considera presencia de infección, cuando los sueros son reactivos en diluciones mayores o iguales a 1/16 (Chagatest HAI Wiener-lab).

- Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi*. La reacción de ELISA se basa en la formación de inmunocomplejos entre antígenos inmovilizados en un soporte y los

anticuerpos presentes en el suero. Se usaron antígenos recombinantes inmovilizados en un soporte. Estos antígenos se obtienen por técnicas de ADN recombinantes a partir de proteínas específicas de los estadios epimastigotes y tripomastigotes del *T. cruzi*, correspondientes a zonas altamente conservadas entre distintas cepas. La tecnología empleada permite asegurar una mezcla antigénica de composición conocida y constante lote a lote, brindando resultados reproducibles, específicos y con una elevada sensibilidad. Las muestras de suero se diluyeron 1/30 en el soporte que contiene los antígenos. Si las muestras contienen los antígenos específicos estos forman un complejo con los antígenos y permanecen unidos al soporte. La fracción no unida se elimina por lavado con Buffer fosfatos pH 7, tras lo que se agregó anticuerpos *anti-immunoglobulina canis* conjugada con peroxidasa (Sigma-Aldrich). Si se produjo la reacción en la primera etapa del proceso, se unirá el sustrato enzimático, que en este caso es peróxido de hidrógeno, liberará oxígeno que reacciona oxidando la tetrametilbencidina (TMB) al derivado tetraacilbencidina, el que es de color azul. Luego, por agregado de ácido sulfúrico, se reduce y pasa a un producto de color amarillo, cuya absorbancia se lee a 450 nm. La lectura de la absorbancia es proporcional a la concentración de anticuerpo anti-*T. cruzi* presente en el suero (Gariglio et al., 2000).

Se realizó el cálculo del cut-off, acorde a las especificaciones del kit, Wiener Chagatest ELISA recombinante 3.0.

Previa a la realización de las muestras por ELISA, se procedió a estandarizar la técnica con diluciones seriadas de suero y de *anti-immunoglobulina canis* conjugada con peroxidasa (Sigma-Aldrich), a fin de obtener las concentraciones apropiadas de trabajo. Para esto, se trabajó con pool de sueros caninos controles positivos y pool de sueros caninos controles negativos.

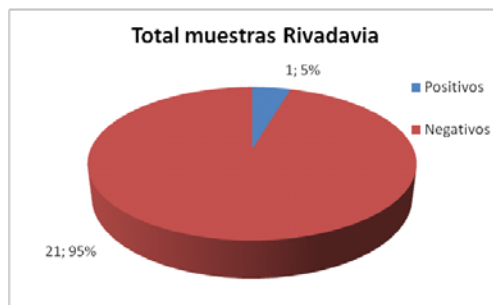
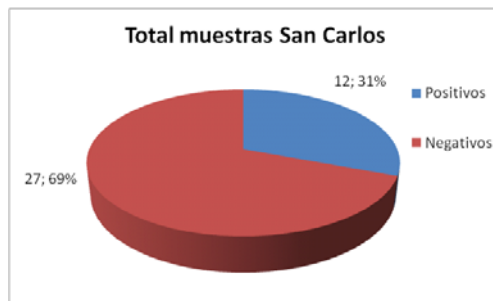
Resultados obtenidos

Se consideraron seropositivos aquellas muestras que resultaron positivas para las dos técnicas serológicas: HAI con títulos mayor o igual a 1/16 y ELISA con valor de Cutt-off superior a 0.41.

Se encontraron 5 muestras indeterminadas. Esto significa que son positivas para una técnica y no para otra. Estas muestras son procedentes de la localidad de Cafayate. Estas muestras deben ser re-evaluadas para un resultado definitivo.

Se muestreó un total de 127 perros, determinándose 14 perros infectados (11.0%)

Distribución de los resultados de las muestras procesadas por localidades:



Características epidemiológicas de los perros infectados con *T. cruzi*

Procedencia	Sexo	Edad/años
Rivadavia	Macho	5.5
San Carlos (SC)	Hembra	4.0
San Carlos	Macho	0.1
San Carlos	Hembra	1.5
San Carlos	Macho	6
San Carlos	Macho	8
San Carlos	Hembra	5
San Carlos	Macho	11
San Carlos	Macho	10
San Carlos	Macho	11
Animaná (SC)	Hembra	7
Animaná (SC)	Hembra	7
Animaná (SC)	Macho	8
Cafayate (SC)	Hembra	10

Discusión de los resultados

Para este trabajo se estudiaron un total de 127 perros procedentes de tres regiones altamente endémicas de la provincia de Salta. El análisis consistió en la aplicación de métodos serológicos previamente usados en el diagnóstico de pacientes humanos (Sánchez Negrette et al., 2008) y su estandarización para el diagnóstico en muestras caninas. El hallazgo de anticuerpos anti-*T. cruzi* en perros procedentes de estas localidades nos indica el contacto de estos animales con el parásito.

Las localidades de Rivadavia y Cafayate habían sido fumigadas meses antes de nuestro muestreo; sin embargo, en las paredes de la vivienda de Rivadavia donde dormía el perro infectado observamos manchas características de defecación de triatomíneos. Dada la edad del perro (5 años y medio), puede ser un contacto previo del animal. Con respecto a la infección del perro de Cafayate ocurre algo si-

milar, pues la casa es alquilada y no se observa presencia de vinchucas, pero ya que el perro tiene 10 años, su infección puede ser de varios años atrás.

Por el contrario, en el departamento de San Carlos es más actual la presencia de vinchucas y es llamativo que 9 de los 12 perros infectados vivan en el mismo barrio y 7 de ellos pertenezcan al mismo propietario. Otros 3 perros, pertenecen a otro barrio y dos son del mismo dueño. Los 12 perros promedian una edad de 6.5 años.

Según Crisante et al., el hecho de detectar una alta proporción de perros infectados, sobre todo en zonas aparentemente de mayor riesgo, nos permite considerar este animal como un importante factor en el mantenimiento de *T. cruzi* como una fuente para la infección humana en el área de estudio. Esto debería ser tomado en consideración al implementar los programas de control de la Enfermedad de Chagas.

Conclusiones

Éste es un estudio preliminar, que nos permitió conocer la presencia de perros infectados en zonas endémicas de la provincia de Salta. Nuestro interés ahora es caracterizar la enfermedad de Chagas en los canes y evaluar la posibilidad de tratamiento. Esto último podrá beneficiar al animal y además permitirá disminuir el riesgo epidemiológico que significa como fuente permanente de *T. cruzi*.

Agradecimientos

Dr. Mario Zaidenberg Programa Nacional de Control de Vectores Jurisdicción NOA, MSN. Laboratorios Wiener-Lab, Santa Fe, Argentina, por donarnos kits de ELISA.

Dr. Diego Marco IPE, CONICET, Salta, por su colaboración técnica.

Este proyecto es subsidiado por el Consejo de Investigaciones de la Universidad Católica de Salta y por Laboratorios Roemmers-Fundación A. J. Roemmers.

Referencias bibliográficas

- Boyden, S. V. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein serum. *J. Exp. Med*; 93: 107-120, 1951.
- Castañera, M. B., M.A. Lauricella, R. Chuit, R. E. Gurtler. El perro como centinela natural de la transmisión de *Trypanosoma cruzi*. *Anales del Primer Congreso Argentino y Primer Congreso latinoamericano de Zoonosis*, Buenos Aires, Argentina, 1995.
- Crisante, G., A. Rojas, M. G. Teixeira, N. Añez. Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Tropica* 98 247-254, 2006.
- Gariglio, R. C., M. V. Felcaro, E. M. Toplikar and G. A. Capriotti. *Boletín del servicio bibliográfico de Wiener Laboratorios SAIC 111*. Santa Fe, Argentina, 2000.
- Gurtler, R. E., M. C. Cecere, R. M. Petersen, D. N. Rubel, N. J. Schweigmann. 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 Med Hyg* 87: 12-15, 1993.
- Konishi, E. Naturally occurring Antibodies that React with Protozoan Parasites. *Parasitology Today* p: 361-364, 1993.
- Pinto Días, J. C. Epidemiology of Chagas Disease. In S. Wendeb, M. E. Camayo, A. Rassi (ed.). *Chagas Disease- American tripanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine*. Brasil, 1992.
- Sánchez Negrette O., F. J. Sánchez Valdez, C. D. Lacunza, M. F. García Bustos, M. C. Mora, A. D. Uncos, M. A. Basombrío. Serological Evaluation of Specific-Antibody Levels in Patients Treated for Chronic Chagas' disease. *Clinical and Vaccine Immunology* Vol 15: 297-302, 2008.
- Schofield Chris J, J. Jannin, and R. Salvatella. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology*, Vol. 22 N° 12:583-588, 2006.
- Zaidenberg M., C. Spillman, R. Carrizo Páez. Control de Chagas en la Argentina. Su evolución. *Revista Argentina de Cardiología*, Vol 72 N° 5. 375-380, 2004.
- World Health Organization. Control of Chagas' disease. Geneva, 1991.