

ARTÍCULO ORIGINAL

Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en *Canis familiaris* del estado Sucre, Venezuela

Mariolga Berrizbeitia^{1,2}, Juan Luis Concepción³, Valentina Carzola⁴, Jéssicca Rodríguez¹, Ana Cáceres³, Wilfredo Quiñones³

¹ Posgrado en Biología Aplicada, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela

² Instituto de Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela

³ Laboratorio de Enzimología de Parásitos, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela

⁴ Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela

Introducción. En Venezuela, la infección por *T. cruzi* en humanos ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, en reservorios ha sido menos abordada. El objetivo de este trabajo fue determinar la seroepidemiología de la infección por *T. cruzi* en perros en el estado Sucre, Venezuela.

Materiales y métodos. Se llevó a cabo un estudio prospectivo transversal en 95 centros poblados y 577 viviendas de los 15 municipios del estado Sucre, Venezuela, entre agosto y noviembre de 2008. Los sueros se evaluaron con el estuche CruziELISA y la prueba de unión de múltiples antígenos (*Multiple Antigen Binding Assay*, MABA). Además, se aplicaron encuestas epidemiológicas para evaluar los factores de riesgo.

Resultados. Se evaluaron 363 perros (edad promedio: $2,6 \pm 2,2$ años, 226 machos y 137 hembras). Con la combinación de las pruebas ELISA/MABA se detectaron 78 sueros positivos, 69 negativos y 10 resultados inconclusos. La seroprevalencia de la infección para *T. cruzi* en perros, en el estado Sucre fue de 22,1 % (IC_{95%}: 20,58-22,4). No se encontró asociación estadística significativa entre la infección por *T. cruzi* en perros y las variables epidemiológicas evaluadas: perros cazadores, dormir al aire libre, deambular libremente por el centro poblado, sexo del animal y hábitos de alimentación. La infección por *T. cruzi* estuvo asociada a la edad de los perros, y fue significativamente mayor en el grupo de 0 a 3 años, en comparación con los perros mayores.

Conclusiones. La alta seroprevalencia detectada en los perros muestra que en esta región de Venezuela existe un factor de riesgo importante de transmisión de este parásito a poblaciones humanas.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, perros, estudios seroepidemiológicos, reservorios, infección, Venezuela.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i2.760>

Seroprevalence of *T. cruzi* infection in *Canis familiaris*, state of Sucre, Venezuela.

Introduction: *Trypanosoma cruzi* infection in humans has been extensively studied in Venezuela; however, in reservoirs it has been less investigated.

Objective: The objective of this study was to determine the seroepidemiology of *T. cruzi* in the state of Sucre, Venezuela.

Materials and methods: A cross-sectional and prospective study conducted in 95 towns and 577 dwellings in the 15 municipalities of the state of Sucre, Venezuela, from August to November, 2008. The evaluation of serum samples was performed with the CruziELISA kit and the multiple antigens binding assays (MABA). Furthermore, epidemiological surveys were applied to evaluate the risk factors.

Results: A total of dogs (average age of $2,6 \pm 2,2$ years, 226 males and 137 females) was evaluated. The combination of the ELISA / MABA tests detected 78 positive sera, sixty-nine negative and 10 of inconclusive results. The seroprevalence of the *T. cruzi* infection in dogs in the state of Sucre, was 22.1% (CI 95%: 20.58-22.4%). No significant statistic association was found between the *T. cruzi* infection in dogs and the evaluated epidemiological variables: hunting dogs that slept outdoors roaming freely in the populated center, sex of the animal and eating habits. The *T. cruzi* infection was associated to the age of canines, being significantly higher in the group of 0 to 3 years, when compared with older dogs.

Contribución de los autores:

Mariolga Berrizbeitia: coordinadora del proyecto a nivel regional, realización del análisis estadístico y escritura del manuscrito.

Juan Luis Concepción: coordinador nacional del proyecto, revisión y aprobación del manuscrito.

Valentina Carzola: realización de los ensayos, contribución en la escritura del manuscrito.

Jessicca Rodríguez: realización de los ensayos.

Ana Cáceres y Wilfredo Quiñones: asesoría en la elaboración del proyecto, revisión del análisis estadístico.

Conclusions: The high *T. cruzi* seroprevalence detected in dogs shows that in this región of Venezuela there prevails an important risk factor of transmissibility of this parasite to human populations.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, dogs, seroepidemiologic studies, infection, reservoirs, infection, Venezuela.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i2.760>

La enfermedad de Chagas se caracteriza por ser una parasitosis zoonótica de gran importancia para la mayoría de los países latinoamericanos, en los cuales se considera un problema de salud pública (1). Asimismo, constituye una de las enfermedades de la pobreza más importante de Latinoamérica (2,3). Entre 7 y 10 millones de personas están infectadas con *T. cruzi* y se presentan, aproximadamente, 50.000 nuevos casos anualmente; ocurre en áreas rurales pobres y más recientemente se ha observado un aumento importante en las áreas urbanas y periurbanas (2,4). El riesgo de transmisión se ha reducido con las medidas de control de la enfermedad y de su vector, y con la tamización en los bancos de sangre en Latinoamérica, gracias a iniciativas como las del Cono Sur, los países andinos y Centroamérica (5).

Las principales formas de transmisión de la enfermedad de Chagas son vectorial, transfusional y congénita, así como otras (oral, trasplantes, accidentes en laboratorios) (6,7). La vía más importante de transmisión y mantenimiento de la endemia chagásica se asocia con la pobreza y ocurre en viviendas con condiciones precarias, tanto en áreas rurales como en periurbanas, en las cuales abundan las colonias de triatominos asociadas con reservorios domésticos y peridomésticos que sirven como fuente de alimentación (8).

En Venezuela se reportan 310.000 individuos infectados por *T. cruzi* y 4'944.000 se encuentran en riesgo de adquirir la infección, y la prevalencia general es de 1,2 %, mientras que en los bancos de sangre se reporta una prevalencia baja de infección por *T. cruzi*, de 0,8 % (9).

La enfermedad de Chagas es una zoonosis nativa de las Américas causada por el parásito *T. cruzi*, el cual se encuentra en la naturaleza afectando no sólo a humanos, sino también a gran cantidad de animales silvestres y domésticos, entre ellos,

marsupiales, perros, roedores y gatos. El estudio de la infección en los reservorios sirve de guía para determinar la presencia de tripanosomátidos y el riesgo que esto representa para las personas que se encuentran en contacto cercano con reservorios infectados por el parásito (10). La transmisión en los animales puede ocurrir por varias vías, incluyendo la ingestión de vectores contaminados. Este hecho se ha demostrado en estudios en los Estados Unidos, en donde la infección por *T. cruzi* sólo se ha reportado en perros y es rara o inexistente en los humanos (11,12).

La infección por *T. cruzi* en perros se ha demostrado en diversos países de Latinoamérica y en los Estados Unidos (13-16). Los perros se consideran un indicador de la transmisión activa, ya que los cánidos infectados y la presencia de vectores incrementan el riesgo para las personas; de hecho, la presencia de un perro infectado en una vivienda cuadruplica el riesgo de la infección en niños (17,18). Además, los perros representan una fuente de alimento constante para los triatominos, los cuales tienen preferencia por la sangre canina (18).

La enfermedad de Chagas en los perros es clínicamente muy parecida a la de humanos, es decir que presenta una fase aguda y una crónica. La fase aguda puede ser fatal en los animales jóvenes o avanzar hasta el desarrollo de cardiopatía con muerte súbita, similar a la observada en humanos durante la fase crónica (19). Por esta razón, los perros se han propuesto como modelos para el estudio de los cambios patológicos en el desarrollo de la enfermedad de Chagas (20). Los perros infectados presentan alteraciones electrocardiográficas tales como: taquicardia ventricular extrasistólica, extrasístoles ventriculares, bloqueo auriculo-ventricular derecho, cambios en la onda T, voltaje bajo del complejo QRS e intervalo PR prolongado (11,21).

En Latinoamérica se han llevado a cabo diversos trabajos de seroprevalencia en perros para infecciones por *T. cruzi*, cuyos resultados varían entre 0 y 11 % (22-24). En Venezuela, existen numerosos reportes de la seroprevalencia de infección por *T. cruzi* en grupos humanos. No obstante, la problemática de esta parasitosis en

Correspondencia:

Mariolga Berrizbeitia, Posgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Avenida Universidad, Cumaná, Estado Sucre, 6101, Venezuela
Teléfono/fax: (58 293) 400 2270
mberriz@yahoo.com

Recibido: 28/06/12; aceptado:20/11/12

perros ha sido menos estudiada. En el país se reportan seroprevalencias en los perros que varían entre 6,9 % y 67,6 % (25-27). La mayoría de estos estudios se han realizado en el occidente de Venezuela, mientras que en el oriente del país no hay ninguno en que se haya evaluado la situación de la infección por *T. cruzi* en los perros.

El objetivo de este trabajo fue determinar la seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en perros en 95 centros poblados rurales, que se encuentran ubicados en los 15 municipios que forman el estado Sucre de Venezuela. También, se evaluaron diversas variables epidemiológicas para establecer la asociación con la infección por *T. cruzi* en los perros estudiados.

Materiales y métodos

Área de estudio

El estudio se hizo en el oriente de Venezuela, específicamente en el estado Sucre, ubicado a 10° 03' y 10° 45' de latitud norte y 61° 52' y 64° 31' de longitud oeste. Se evaluaron los 15 municipios que conforman el estado: Andrés Bello, Andrés Mata, Arismendi, Bolívar, Benítez, Bermúdez, Cajigal, Cruz Salmerón Acosta, Libertador, Mariño, Montes, Ribero, Mejías, Sucre y Valdez. La temperatura promedio del estado Sucre es de 28 °C y el estudio se ejecutó en un gradiente altitudinal entre 0 a 990 msnm. Las actividades económicas predominantes en el estado Sucre lo constituyen la pesca, el turismo y la agricultura, y los productos agrícolas más importantes son el cacao, el coco, el café, la caña de azúcar y el algodón (28).

Diseño del estudio y selección de la muestra

Se hizo un estudio prospectivo de corte transversal con un muestreo probabilístico aleatorio, en el cual se utilizó un diseño por conglomerados, bietápico, donde las unidades primarias del muestreo fueron los centros poblados en el área rural y las unidades secundarias, las viviendas.

Las unidades primarias se eligieron proporcionales al tamaño del municipio, utilizando un muestreo aleatorio simple sin reemplazo, y las viviendas se seleccionaron de acuerdo con un muestreo sistemático con origen aleatorio (con reemplazo), cuyo tamaño fue prefijado en seis viviendas por unidad primaria.

En la muestra se incluyeron únicamente los cánidos que habitaban en las casas seleccionadas, identificados con nombre y edad por el dueño, previo consentimiento informado por parte de los

dueños; se excluyeron los perros callejeros o los no identificados. Se evaluó la seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en los perros de 95 centros poblados y 577 viviendas de los 15 municipios que componen el estado Sucre, en el período comprendido entre agosto y noviembre de 2008 (figura 1) (29).

El modelo de muestreo se diseñó con base en los directorios del Instituto Nacional de Estadística en el censo del 2002 (actualizado para el 2008) y la cartografía suministrada por el Instituto Nacional de Cartografía. El tamaño de la muestra se calculó de manera que fuese válido para los centros poblados y para las viviendas en las zonas en estudio, con un nivel de confianza de 95 % y con un límite máximo de error de estimación del 2 % (cuadro 1).

Toma de muestra de sangre en perros

Las muestras de sangre de los perros se obtuvieron por venopunción. Se transportaron a 4 °C al laboratorio y se centrifugaron a 1.000g durante 10 minutos. Los sueros obtenidos se almacenaron a -70 °C hasta su posterior uso.

Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico se hizo con el kit *CruziELISA*, y la prueba de unión de múltiples antígenos (*Multiple Antigen Binding Assay*, MABA). Esta última se efectuó para confirmar todas las muestras que resultaran positivas para infección por *T. cruzi* con el kit *CruziELISA* y, también, para procesar muestras escogidas de forma aleatoria de los sueros de perros que resultaron negativos.

Prueba *CruziELISA*

Se utilizó la prueba ELISA estandarizada en el Laboratorio de Enzimología de Parásitos de la Universidad de los Andes, la cual utiliza una fase sólida. Los pozos se sensibilizaron con 20 ng de cada antígeno recombinante purificados a homogeneidad por cromatografía de afinidad a metales (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, IMAC) PGR31-His (quimera de tres antígenos), PGR30-His y rTc24-His de *T. cruzi* (30). Los ensayos se hicieron siguiendo el manual de instrucciones del kit *CruziELISA*, el cual se describe a continuación.

Se colocaron 200 µl de diluyente de muestra en la primera fila de la policubeta (blanco) y 190 µl del mismo diluyente en el resto de los pocillos de la misma, los cuales fueron usados para las muestras y controles (positivos y negativos). Posteriormente, a cada pozo se le agregaron 10 µl de cada control

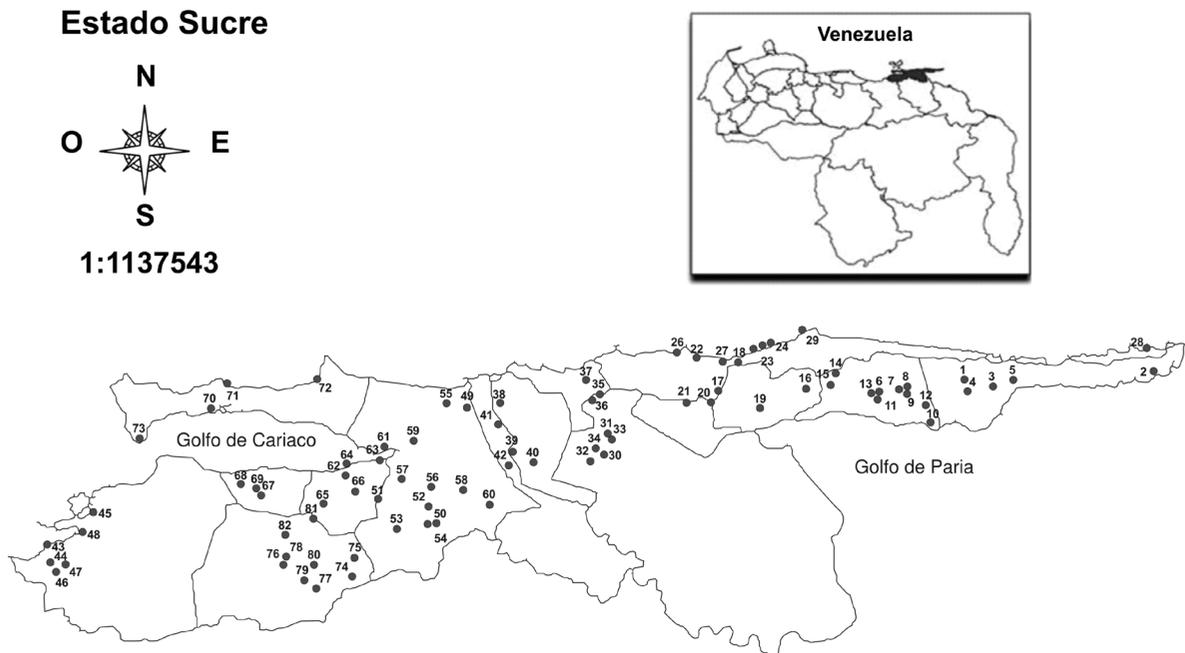


Figura 1. Distribución de los centros poblados seleccionados para evaluar la infección por *Trypanosoma cruzi* en perros en el estado Sucre, Venezuela

- | | | |
|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 1. El Hoyo | 33. Guatamare | 65. Maturincito |
| 2. Macuro | 34. El Algarrobito | 66. Belén |
| 3. Guarama Arriba | 35. El Calvario | 67. Guaracayal |
| 4. Guaraguarita | 36. La Cumbre del Rincón | 68. Sotillo |
| 5. Río Salado | 37. Cusma | 69. Corozal |
| 6. Valencia-La Concepción | 38. Guaricuco | 70. La Angoleta |
| 7. Punta Brava-La Meseta | 39. Cedeño de los Negros | 71. Peñas Negras |
| 8. San Antonio | 40. Guaruta-El Toporo | 72. Guayacán |
| 9. Maribela | 41. El Mayal | 73. Punta Arenas |
| 10. Soro | 42. Las Minas | 74. Begote |
| 11. Marabal | 43. Santa Cruz | 75. Mapurite |
| 12. Juan Pedro | 44. Hoyo de Zurita | 76. San Salvador |
| 13. Vericallar | 45. Mochima | 77. Los Dos Ríos-Los Mangos |
| 14. Mundo Nuevo | 46. El Maco | 78. Aricagua |
| 15. El Llanito | 47. San Pedrito-La Florida | 79. Los Dos Ríos-El Berral |
| 16. El Paujil | 48. Yaguaracual | 80. Las Vegas-El Naranjal |
| 17. Río El Medio-Agua Santa | 49. Cacahual | 81. El Potrero |
| 18. Santa Elena Arriba | 50. Las Amanitas | 82. Las Calderas-El Zamuro |
| 19. El Chispero | 51. San Juan de Cotua | 83. Cipara-La Peña-Boca de Cumaná |
| 20. Guayana | 52. Tarpa | 84. De Buenos Aires (F) |
| 21. Quebrada de Juan Rojas | 53. San Ramón, Santa Ana | 85. Mauraco Arriba |
| 22. Pui Pui | 54. Aguas Calientes | 86. Los Ajjes |
| 23. San Juan de Las Galdonas | 55. La Soledad | 87. Chuparipal Arriba |
| 24. Guarataro | 56. Quebrada Seca-El Tambor | 88. Loma de Gran Pobre |
| 25. Guacuco | 57. Santa Isabel-La Ceiba | 89. El Cedro |
| 26. Alto Medina-El Paraíso | 58. Catuaro | 90. Tacarigua |
| 27. Llanada de Cangua | 59. Campoma | 91. La Cumbre Brazón |
| 28. Uquire | 60. Marvascual | 92. Los Tres Picos |
| 29. San Juan de Unare | 61. Chiguana | 93. San Fernando de Tataracual |
| 30. Algarrobo-La Flojera | 62. La Soledad | 94. Sabaneta |
| 31. Cumbres de Chaguaramas | 63. La Peña | 95. La Sabana-Marutón |
| 32. Guaruchal | 64. Pericantár | 96. Río Grande |

Cuadro 1. Resultados del número de viviendas y centros poblados evaluados para determinar la infección en perros por *Trypanosoma cruzi* en el estado Sucre, Venezuela

Nombre del municipio	Centros poblados	Total de viviendas	Peso	Muestras de viviendas	Centros poblados muestreados
Andrés Eloy Blanco	16	731	0,02	11	2
Andrés Mata	23	1.293	0,04	20	3
Arismendi	76	4.275	0,12	67	11
Benítez	93	3.395	0,09	53	9
Bermúdez	12	682	0,02	11	2
Bolívar	27	1.138	0,03	18	3
Cajigal	42	1.458	0,04	23	4
Cruz Salmerón Acosta	33	2.401	0,07	38	6
Libertador	11	1.016	0,03	16	3
Mariño	44	3.729	0,10	59	10
Mejía	39	2.005	0,06	32	5
Montes	121	4.416	0,12	69	12
Ribero	95	5.136	0,14	81	13
Sucre	83	2.411	0,07	38	6
Valdez	38	2.061	0,06	32	5
Total	753	36.147	1	568	95

y de las muestras de sueros de perros. Para evitar la evaporación, se cubrió la placa de ELISA con un sellador de plástico y luego se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Al transcurrir este tiempo, los pocillos se lavaron cinco veces con 250 µl de solución tampón de lavado por pocillo. Al finalizar el último lavado, se eliminó completamente el líquido residual, invirtiendo la policubeta y golpeándola varias veces sobre el papel absorbente. Se agregaron a cada pocillo dos gotas de conjugado, mezclando suavemente y aplicando golpecitos en los lados de la policubeta por 10 segundos. Se cubrió la placa con papel film y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Luego se lavó cinco veces con 250 µl de solución tampón de lavado por pocillo. Posteriormente, a cada pocillo se agregaron 100 µl de sustrato/revelador (tetrametilbencidina) y se procedió a incubar la placa por cinco minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Se detuvo la reacción enzimática agregando 50 µl de solución de parada (ácido clorhídrico 0,5 N). Se leyó la microplaca a 450 nm en un lector de ELISA (BIOTRAK II). El punto de corte se determinó para cada placa mediante la siguiente fórmula: punto de corte = promedio de los controles negativos + 0,200 de densidad óptica.

Prueba de unión de múltiples antígenos (MABA)

La transferencia de los antígenos a la membrana de nitrocelulosa (0,45 µm, Hybond, Amersham Biosciences, GE) se hizo incubando por tres horas a temperatura ambiente en solución tampón de carbonato pH 9,6 que contenía 500 ng de cada

antígeno recombinante PGR31-His (quimera de tres antígenos, y una mezcla de PGR30-His y PGR24-His) en dos líneas paralelas, usando un *Mini-blotter 28 SL* (Immunogenetics, Cambridge, Mass., USA). Después de bloquearla (5 % de leche descremada – 0,1 % Tween 20) por 1 hora a temperatura ambiente y lavarla con PBS, cada membrana fue secada al aire y cortada en tiras (ancho: 4 mm, longitud: 2 cm).

Las tiras se incubaron por 1 hora a 37 °C con agitación suave en canales independientes (Mini Incubation Tray, BioRad) con 10 µl de los sueros de los perros diluidos a 1:100 con 1 % de leche descremada en PBS-Tween 20 por 1 hora. Las tiras se lavaron cinco veces con PBS-Tween 20 y se incubaron por 1 hora a 37 °C con agitación suave con 1 ml de anticuerpo secundario anti-IgG de perro conjugado a peroxidasa (γ -cadena-específica, Sigma Chemical Co.) diluido (1:5000). Después de cinco lavados con PBS-Tween 20, se añadió a cada canal 1 ml de una solución de 3,3 diaminobencidina que contenía 0,1 % de peróxido de hidrógeno (Sigma Chemical Co.); las tiras se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente hasta que se desarrollara el color. Finalmente, las tiras se lavaron y secaron al aire para proceder a las lecturas visuales de los resultados, en las cuales los perros se consideraban positivos en los ensayos de diagnóstico si al menos uno de los antígenos/banda era visualizado (30).

Variables epidemiológicas

Con la finalidad de identificar los factores de riesgo asociados a la infección por *T. cruzi* en perros, se

entrevistó a los dueños de los cánidos para dar respuesta de forma voluntaria a las encuestas aplicadas en el estudio. En éstas, las variables evaluadas fueron edad, sexo, costumbre de cazar, dormir al aire libre, deambular por el centro poblado y los hábitos alimenticios como comer ratas y animales silvestres.

Análisis estadístico

Para establecer los posibles factores de riesgo analizando las variables epidemiológicas y los resultados de las pruebas serológicas, se aplicó la prueba de ji al cuadrado con corrección de Yates. Para determinar la asociación entre la infección por *T. cruzi* en perros y la edad, se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. También, se determinaron otros índices seroepidemiológicos de la infección por *T. cruzi* en perros: densidad de infección, y dispersión en viviendas y en centros poblados. La razón de probabilidades (*Odds Ratio*, OR), se determinó para la evaluar la probabilidad de un evento en presencia o ausencia de un factor de riesgo (31). Se utilizaron los programas de computador Microsoft Excel® 2010, SPSS®, versión 15, Statgraphics, para el procesamiento y análisis estadístico de los datos.

Consideraciones éticas

El trabajo de campo se llevó a cabo con un equipo conformado por dos sociólogos, un bioanalista, un biólogo y los líderes comunitarios de cada centro poblado para la sensibilización de la población, aplicación de las encuestas epidemiológicas, toma de las muestras de sangre de los perros y supervisión. Las muestras de sangre de los perros se tomaron después de que los dueños lo aceptaran de forma voluntaria, firmando el consentimiento informado. El protocolo del estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética del Bioterio Central (BIOULA) de la Universidad de Los Andes (Venezuela).

Resultados

Tamaño de la muestra

La muestra de la población rural del estado Sucre quedó integrada por 95 centros poblados y 576 viviendas, y se evaluaron los cánidos domésticos encontrados en las viviendas seleccionadas. La muestra se distribuyó aleatoriamente en forma proporcional al tamaño de los municipios del estado Sucre. En cada centro poblado se seleccionaron aleatoriamente seis viviendas (cuadro 1). No se consiguieron registros para conocer la población

total de perros domésticos del estado Sucre. Los datos correspondientes al número total de centros poblados y viviendas del estado Sucre, fueron suministrados por el Instituto Nacional de Estadística.

Diagnóstico serológico

Se evaluaron 363 perros, con un promedio de edad de $2,6 \pm 2,2$ años (rango: 0 a 12 años), de los cuales, 226 (62,2 %) eran machos y 137 (37,7 %) hembras. El 22,03 % (80 perros) de los sueros resultaron positivos por la prueba CruziELISA, y 77,96 % (283), negativos. Todas las muestras positivas por la prueba ELISA y 77 muestras negativas escogidas aleatoriamente, fueron analizadas por MABA. Con esta última prueba, se clasificaron 86 sueros de perros como positivos y 71 como negativos. Asimismo, con la combinación de las pruebas ELISA y MABA se detectaron 78 sueros positivos, 69 negativos y 10 inconclusos (cuadro 2).

Para determinar la seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en perros, en el estado Sucre, se tomaron en cuenta los 78 sueros positivos en ambas pruebas, los 206 sueros negativos por ELISA y que no se evaluaron por MABA, y los 69 sueros negativos por ambas técnicas; los 10 con resultados inconcluso, no se incluyeron para este cálculo. Por lo tanto, la seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en perros del estado Sucre, utilizando dos pruebas de diagnóstico serológicas para confirmar las muestras positivas, como lo recomienda la OMS (32), fue de 22,1 % ($78/353 \times 100$) con un intervalo de confianza de 95 % ($IC_{95\%}$) de 20,58-22,40 (cuadro 2).

Las proyecciones de este valor de seroprevalencia a toda la zona rural del estado Sucre poseen la limitación de que se desconoce la población total de perros. Sin embargo, se podría estimar suponiendo que la proporción de perros declarados por vivienda (0,63) en este trabajo se mantiene. En este caso, la población de perros en la zona rural debería estar entre 23.698 y 30.388, y el número de animales seropositivos podría ser de 6.025, aproximadamente .

Índices seroepidemiológicos.

Se encontraron perros seropositivos en 14 de 15 de los municipios evaluados, 49 de 95 de los centros poblados y en 75 de 577 viviendas (cuadro 3). La mayor seroprevalencia fue encontrada en los municipios Benítez, Ribero, Sucre y Montes (cuadro 4). Igualmente, los centros poblados con mayores seroprevalencias fueron Santa Cruz y Hoyo de

Zurita (0,83 %; IC_{95%}: 0-1,76, municipio Sucre), Punta Arena (0,83 %; IC_{95%}: 0-1,76, municipio Cruz Salmerón Acosta), Cachual (1,10 %; IC_{95%}: 0-2,17, municipio Ribero), La Soledad (0,83%; IC_{95%}: 0-1,76, municipio Ribero), La Cumbre del Rincón (0,83 %;

IC_{95%}: 0-1,76 %, municipio Benítez), Chuparipal arriba (0,83 %; IC_{95%}: 0-1,76, municipio Valdez).

Variables epidemiológicas

En este trabajo se evaluó la asociación de la infección por *T. cruzi* con diversas variables o factores de riesgo epidemiológicos y se encontró que no hubo correlación estadística significativa entre la infección por *T. cruzi* en perros y la costumbre de los cáninos de cazar, dormir al aire libre y deambular libremente por el centro poblado y, tampoco con ciertos hábitos alimenticios de los perros como comer ratas y animales silvestres o el sexo (cuadro 5). Sin embargo, la prueba de Kruskal-Wallis mostró correlación estadística significativa entre la infección por *T. cruzi* en los perros y la edad; el mayor porcentaje de perros seropositivos se encontró en el grupo etario de 0 a 3 años de edad (cuadro 6).

Igualmente, se comparó la seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en las dos regiones geográficas del estado Sucre, la del golfo de Cariaco y la del golfo de Paria; la del golfo de Cariaco está conformada por los municipios Montes, Sucre, Cruz Salmerón Acosta, Mejías, Ribero y Bolívar; la del golfo de Paria está conformada por los municipios Benítez, Andrés Eloy Blanco, Libertador, Bermúdez, Valdez, Andrés Mata, Arismendi, Mariño y Cajigal. No se encontró diferencia estadística significativa entre estas dos regiones geográficas, lo que indica que los perros infectados por *T. cruzi* se encuentran distribuidos por todo el estado ($\chi^2=2,6$; grados de libertad=1; $p>0,05$).

Cuadro 2. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en perros en el estado Sucre con la diferentes técnicas utilizadas

	ELISA	MABA	ELISA/MABA
Sueros positivos	80	86	78
Sueros negativos	283	71	69
Inconclusos	-	-	10
No realizado	-	206	
Total (n)	363	363	157
*Seroprevalencia	22,0 % (IC: 17,8-26,3 %)	-	
*Seroprevalencia definitiva	22,1 % (IC: 17,8-26,4%)		

*Seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* con la prueba CruzELISA

+ Seroprevalencia definitiva de la infección por *T. cruzi* utilizando ELISA y MABA

ELISA: prueba de inmunoabsorción enzimática

MABA: prueba de unión de múltiples antígenos

IC: intervalo de confianza al 95 %

Cuadro 3. Índices seroepidemiológicos de la infección por *Trypanosoma cruzi* en perros en el estado Sucre

Índices	Valor
Infección por <i>T. cruzi</i> en perros	22,1 %
Densidad de infección por <i>T. cruzi</i> en perros	0,1
Dispersión en viviendas	13,0 %
Dispersión en centros poblados	51,6 %

Cuadro 4. Seroprevalencia en perros de la infección por *Trypanosoma cruzi* en el estado Sucre

Municipio	n	Pos (n)	Neg (n)	Inc (n)	Prevalencia (%)	IC 95 %
Arismendi	24	4	17	3	1,1	0,0-2,2
Andrés Eloy Blanco	9	0	8	1	0	-
Andrés Mata	10	3	6	1	0,8	0,0-1,8
Benítez	51	12	39	0	3,4	1,5-5,2
Bermúdez	2	1	1	0	0,3	0,0-0,8
Bolívar	2	1	1	0	0,3	0,0-0,8
Cajigal	12	1	11	0	0,3	0,0-0,8
Cruz Salmerón Acosta	21	7	12	2	1,9	0,5-3,4
Libertador	8	2	6	0	0,6	0,0-1,3
Mariño	43	7	36	0	1,9	0,5-3,4
Mejías	27	5	22	0	1,4	0,2-2,6
Montes	55	10	45	0	2,8	1,1-4,4
Ribero	59	11	45	3	3,1	1,3-4,9
Sucre	17	10	7	0	2,8	1,1-4,6
Valdez	23	4	19	0	1,1	0,0-2,2
Total	363	78	275	10		

n: muestra de población; Pos: positivos; Neg: negativos; Inc: inconclusos; IC: intervalo de confianza;

Cuadro 5. Factores de riesgo asociados a la infección por *Trypanosoma cruzi* en perros en el estado Sucre, Venezuela

Factor de riesgo	N°	Porcentaje de positivos para el factor de riesgo (n)	OR	IC 95 %	P
1) Sexo					
Hembra	137	18,2 (25)	0,8	0,4-1,3	0,4
Macho	226	23,4 (53)			
2) Hábitos de cazar					
Sí	114	20,2 (23)	0,8	0,4-1,4	0,4
No	234	23,5 (55)			
3) Dormir en el peridomicilio					
Sí	328	21,6 (71)	0,5	0,2-1,3	0,1
No	20	35,0 (7)			
4) Comer los animales que cazan					
Sí	95	17,9 (17)	0,7	0,4-1,2	0,2
No	253	24,1 (61)			
5) Comer ratas					
Sí	17	29,4 (5)	1,5	0,5-4, 3	0,3
No	331	22,05 (73)			
6) Deambular libremente					
Sí	226	21,7 (49)	0,9	0,5-1,5	0,6
No	122	23, 8 (29)			

n: muestra de población, OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confianza; P: probabilidad.

Cuadro 6. Distribución de la seroprevalencia para anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en perros por edades del estado Sucre

Edad (años)	Pos	Neg	*PG	+PE	P
0-3	55 (15,7 %)	213 (61,0 %)	15,8	20,5	
4-7	18 (5,2 %)	48 (13,8 %)	5,2	27,3	*0,01
8-12	4 (1,1 %)	11 (3,2 %)	1,1	26,7	Sig
Total	77 (22,1 %)	272 (77,9 %)			

*Prevalencia general (PG): porcentaje de seropositividad de cada grupo por edad, respecto a la población total; +Prevalencia específica (PE): porcentaje de seropositivos de cada grupo por edad, respecto a la población de cada grupo etario; Prueba de Kruskal-Wallis: 8,7; p: probabilidad; Sig: significancia; $p < 0,05$: significativo

Discusión

Este es el primer trabajo llevado a cabo en los 15 municipios que integran el estado Sucre, ubicado en la región oriental de Venezuela. La seroprevalencia general en los cánidos fue de 21,5 %, mayor que la reportada en estudios en el estado Lara, área que se considera endémica para la infección por *T. cruzi*; en el municipio Urdaneta de este estado, se reportaron seroprevalencias de 6,9 % para la parroquia San Miguel (333 perros) y de 6,4 %, para la de Xaguas (110 perros) (25,27).

Un valor mayor de seroprevalencia en perros que el encontrado por nosotros en el estado Sucre, fue reportado por Crisante, *et al.* (26), quienes evaluaron 565 perros mestizos en 47 centros poblados (rurales) pertenecientes a

ocho estados del occidente de Venezuela, con una seroprevalencia de 67,6 %. También en ese estudio, se reportó que el 84,0 % de los perros que vivían cerca de personas seropositivas presentaron anticuerpos específicos para *T. cruzi*. El análisis reveló que, de las 47 poblaciones muestreadas, el 91,5 % tenían perros seropositivos para *T. cruzi*, hubo hasta 62,0 % de positivos en los estados Falcón y Cojedes, y 100,0 % de positivos en los otros estados estudiados.

Igualmente, se han hecho estudios de seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en diferentes países de Latinoamérica. En Brasil (São Paulo) y Colombia (Bogotá) se evaluaron 365 perros, todos los cuales resultaron negativos mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (33). En la localidad de la Para en Córdoba (Argentina),

Graiff, *et al.* (34), determinaron una seroprevalencia de 11,1 %, en 100 perros evaluados por ELISA e inmunofluorescencia indirecta, mientras que en la región del Chaco se encontró una mayor seroprevalencia en perros, de 15,1 % (16/106) (35).

En otro estudio serológico en 221 caninos criollos de seis municipios del departamento de Tolima, Colombia, la seroprevalencia fue de 1,4 %. Las muestras de sueros se analizaron con la técnica de *Western blot*, usando los antígenos TESA de *T. cruzi*. La baja prevalencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en esa población canina, sugiere que los perros juegan un papel limitado como reservorios en la transmisión de *T. cruzi* en esa zona de Colombia, mientras que, en la presente investigación en el estado Sucre, la elevada seroprevalencia en los perros los hacen potenciales reservorios de gran importancia para la transmisión de la infección (36).

En las localidades rurales de San Juan Bautista Sakcabchen y Crucero San Luis en el estado de Campeche, México, Hernández, *et al.* (37), encontraron una seroprevalencia en perros de 61,5 % y 65,4 %, respectivamente, mayores que la encontrada en este trabajo en las áreas rurales del estado Sucre.

Al analizar los índices seroepidemiológicos para la infección por *T. cruzi* en perros del estado Sucre, se evidencia que, aproximadamente, el 50 % de los centros poblados tiene un porcentaje importante de perros infectados, igualmente, un valor significativo de viviendas que albergan perros que son potenciales reservorios de la infección.

Además, en 14/15 municipios evaluados se encontraron perros seropositivos. Los municipios del estado Sucre con mayores seroprevalencias fueron Sucre, Benítez, Montes y Ribero, todos pertenecientes a la zona geográfica del golfo de Cariaco. Estos municipios se han identificado como las zonas con mayor número de humanos seropositivos para la infección por *T. cruzi* en este estado (38-40). El golfo de Cariaco posee temperaturas que oscilan entre 19 y 27 °C, un tipo de clima semiárido, una pluviosidad anual de 375 mm y una altitud entre 3 y 2.600 msnm, y en la península de Araya se encuentra un clima extremo de aridez y sequía (28). El golfo de Paria posee una temperatura que oscila entre 25 y 34 °C, una altitud entre 200 y 800 msnm, una pluviosidad anual entre 1.200 y 2.000 mm y un clima boscoso. Sin embargo, aunque las seroprevalencias más elevadas se

observaron en la región del golfo de Cariaco, y aunque estos dos golfos presentan diferencias en cuanto a su ecología, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de municipios agrupados dentro de las dos áreas geográficas evaluadas (golfo de Cariaco y Paria) (28).

Con respecto a las variables epidemiológicas evaluadas, como la costumbre de los perros de cazar, dormir al aire libre y deambular libremente por el centro poblado, los hábitos alimenticios del canino como comer ratas, comer animales silvestres o el sexo del animal, no se encontró una asociación estadística significativa de estas variables con la infección por *T. cruzi* en los perros evaluados. Sin embargo, en un trabajo en Oklahoma (Estados Unidos), en el que se evaluó la infección por *T. cruzi* en 301 perros utilizando la técnica de radioinmunoprecipitación (RIA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se encontró un total de 11 (3,6 %) perros positivos, de los cuales, 10 eran cazadores, contrariamente a lo encontrado en el presente trabajo, en donde una menor proporción de perros seropositivos (23/55) eran cazadores (15,41). Igualmente, en un estudio en 35 perros y sus propietarios en un área al sur de Mérida en el estado de Yucatán (México), en el cual se utilizaron las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y *Western blot*, el porcentaje total de perros seropositivos fue de 34,0 %, mientras que la infección en humanos fue de 8,0 %. A diferencia de los resultados encontrados en el presente trabajo, esos autores demostraron que hay un alto riesgo de la infección por *T. cruzi* en los perros que dormían al aire libre (42). En cuanto al sexo del animal, no hubo diferencias significativas entre perros machos o hembras infectados por el parásito (10).

Por otra parte, se estableció una asociación estadística significativa entre la edad de los cánidos y la infección por *T. cruzi*, y se encontró que el mayor número de perros infectados está en el grupo etario de 0 a 3 años, seguido del grupo de 4 a 7 años, y el menor número de perros seropositivos se encontró en edades mayores de los 7 años.

Este resultado contrasta con la seroprevalencia en humanos, la cual se incrementa significativamente con la edad de las personas (43,44). En otros estudios se ha demostrado que los perros con edades jóvenes se encuentran entre los más afectados por la infección por *T. cruzi* (22). Este resultado de que los perros menores de tres años presenten mayores porcentajes de seroprevalencia,

indica claramente infecciones recientes de los animales con el parásito.

A pesar de que en este estudio no podemos concluir cuál es la vía de transmisión de *T. cruzi* en los perros (vectorial, oral o congénita), sí se pone de manifiesto el riesgo que representan los perros positivos a infecciones para *T. cruzi*, ya que actúan como reservorios en los domicilios y peridomicilios. Los perros se infectan de la misma forma que los humanos, por heces u orina de los vectores contaminados con el parásito, el cual penetra a través de las mucosas y conjuntivas del animal. Igualmente, los perros ingieren los vectores, lo cual constituye otro mecanismo de transmisión por vía oral, la cual ha demostrado ser muy efectiva en infecciones experimentales (45). Este hecho podría explicar la razón de que en algunas áreas se encuentre un elevado número de perros seropositivos, mientras la misma infección en los humanos es baja o a veces inexistente (11).

Posiblemente, la falta de asociación entre las diferentes variables evaluadas y la infección por *T. cruzi* en perros, se debió a algún otro factor de riesgo que no fue evaluado, como puede ser la ingestión de vectores por los perros, un mecanismo de infección muy efectivo en los cánidos (11). Catalá, *et al.* (46), en un estudio desarrollado en las provincias Salta, Jujuy, La Rioja, Santa Fe, Córdoba y Santiago del Estero, ubicadas en la región central y nororiental de Argentina, encontraron que las viviendas con valores más elevados para la infección por *T. cruzi* fueron aquellas en la que perros o gallinas compartían la habitación humana. Los perros en el domicilio fueron los responsables de una mayor infestación de los vectores recolectados. Asimismo, Estrada, *et al.* (47), reportaron en la municipalidad de Tejuzilco en el estado de México (México), una correlación directa ($r^2=0,955$) de resultados positivos entre la infección por *T. cruzi* en humanos y perros. Esos resultados sugieren que puede haber una transmisión bidireccional de perros a humanos y de humanos a perros, cuando hay vectores en los domicilios o peridomicilios.

En resumen, se puede concluir que los perros representan un reservorio importante para la infección por *T. cruzi* en el estado Sucre de Venezuela; estos se encuentran distribuidos en todo el estado y debido a que la mayoría se encontraba en el grupo etario más joven, se puede afirmar que actualmente existe transmisión por *T. cruzi* activa reciente en perros en esta región.

Sin embargo, en la presente investigación no se puede concluir el tipo de vía de contaminación de los cánidos. Igualmente, es importante recalcar que hasta el momento se desconocen los índices entomológicos actuales del estado Sucre, lo cual nos permitiría explicar la alta seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en los perros evaluados. La falta de asociación entre las variables epidemiológicas evaluadas y la infección por *T. cruzi* en perros, en la presente investigación, sugiere la posibilidad de que exista un factor de riesgo de transmisión, el cual no fue evaluado y posiblemente sea responsable de la seroprevalencia encontrada en estos reservorios. Los valores de infección por *T. cruzi* en perros en el estado Sucre, constituyen un alerta epidemiológica para que se establezcan las políticas y medidas de control que sean necesarias para prevenir la infección de *T. cruzi* en humanos.

Agradecimientos

A todos los habitantes del estado Sucre, que gentilmente permitieron la toma de muestras de los perros; a los líderes comunitarios de cada población rural evaluada, quienes apoyaron y ayudaron a todo el equipo de campo; a la Dirección de Saneamiento Ambiental y Endemias Rurales del estado Sucre, por todo el apoyo brindado en la logística durante la ejecución de este proyecto, y al Centro de Asesorías y Proyectos Estadísticos, Escuela de Estadística, Universidad de Los Andes, Venezuela.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no hay conflicto de intereses.

Financiación

Este proyecto fue financiado por el Ministerio del Poder Popular para la Salud, Dirección de Investigación y Educación, Proyecto N° 490029000 y por el Proyecto Misión Ciencia N° 2007001425.

Referencias

1. **Panamerican Health Organization.** Salud en las Américas 2007. Fecha de consulta: 25 de mayo de 2011. Disponible en: <http://www.paho.org/hia/archivosvol1/volregionalesp/SEA07%20Regional%20SPA%20Front%20Matter.pdf>.
2. **Yamagata Y, Nakagawa J.** Control of Chagas disease. *Adv Parasitol.* 2006;61:129-65. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)61004-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X(05)61004-4)
3. **World Health Organization.** Working to overcome the global impact neglected tropical diseases. First WHO Report on neglected tropical diseases. Fecha de consulta:

- 18 de mayo de 2011. Disponible en: <http://www.gsk.com/media/downloads/WHO-report-on-NTD.PDF>
4. **Senior K.** Chagas disease: Moving towards global elimination. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7:572. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70194-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70194-9)
 5. **Moncayo A.** Chagas disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98:577-91. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000500001>
 6. **Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV.** Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007;115:1109-23. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.624296>
 7. **Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR.** The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2:e300. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000300>
 8. **Salvatella R, Schofield C.** Enfermedad de Chagas. Iniciativa para su control en Latinoamérica. *Biomedicina.* 2006;1:36-46.
 9. **Organización Panamericana de la Salud.** Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Montevideo: Organización Panamericana de la Salud. Fecha de consulta: 25 de mayo de 2011. Disponible en: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/chagas19.pdf>.
 10. **Reyes L, Sileski E, Cerdas C, Chinchilla M, Gerrero O.** Presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en perros de Costa Rica. *Parasitol Latinoam.* 2002;57:66-8. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122002000100016>
 11. **Montenegro VM, Jimenez M, Dias JC, Zeledon R.** Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:491-4. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000400006>
 12. **Shadomy SV, Waring SC, Martins-Filho OA, Oliveira RC, Chappell CL.** Combined use of enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry to detect antibodies to *Trypanosoma cruzi* in domestic canines in Texas. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11:313-9. <http://dx.doi.org/10.1128/CDLI.11.2.313-319.2004>
 13. **Barbabosa-Pliego A, Diaz-Albiter HM, Ochoa-García L, Aparicio-Burgos E, López-Heydeck SM, Velásquez-Ordóñez V, et al.** *Trypanosoma cruzi* circulating in the southern region of the State of Mexico (Zumpahuacán) are pathogenic: A dog model. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:390-5.
 14. **Barbabosa-Pliego A, Gil PC, Hernández DO, Aparicio-Burgos JE, de Oca-Jiménez RM, Martínez-Castañeda JS, et al.** Prevalence of *Trypanosoma cruzi* in dogs (*Canis familiaris*) and triatomines during 2008 in a sanitary region of the State of Mexico, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11:151-6. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2009.0163>.
 15. **Bradley KK, Bergman DK, Woods JP, Crutcher JM, Kirchhoff LV.** Prevalence of American trypanosomiasis (Chagas disease) among dogs in Oklahoma. *J Am Vet Med Assoc.* 2000;217:1853-7.
 16. **Rowland ME, Maloney J, Cohen S, Yabsley MJ, Huang J, Kranz M, et al.** Factors associated with *Trypanosoma cruzi* exposure among domestic canines in Tennessee. *J Parasitol.* 2010;96:547-51. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2299.1>
 17. **Gurtler RE, Cecere MC, Castanera MB, Canale D, Lauricella MA, Chuit R, et al.** 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.* 1996;55:24-31.
 18. **Basombrio MA, Segura MA, Mora MC, Gómez L.** Field trial of vaccination against American trypanosomiasis (Chagas' disease) in dogs. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49:143-51.
 19. **Caliari MV, do Pilar Machado R, de Lana M, Caja RA, Carneiro CM, Bahia MT, et al.** Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2002;44:273-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652002000500008>
 20. **Machado EM, Camilo Junior DJ, Pinheiro SW, Lopes ER, Fernandes AJ, Dias JC, et al.** Morphometry of submucous and myenteric esophageic plexus of dogs experimentally reinfected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:545-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762001000400017>
 21. **Meurs KM, Anthony MA, Slater M, Miller MW.** Chronic *Trypanosoma cruzi* infection in dogs: 11 cases (1987-1996). *J Am Vet Med Assoc.* 1998;213:497-500.
 22. **Postma G, Lauricella M.** Ausencia de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en perros de barrios carenciados de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. *Rev Vet.* 2006;17:81-3.
 23. **Turriago C, Vallejo G, Guhl F.** Seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* en perros de dos áreas endémicas de Colombia. *Rev Med.* 2008;16:11-8.
 24. **Umezawa ES, Souza AI, Pinedo-Cancino V, Marcondes M, Marcili A, Camargo LM, et al.** TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. *Acta Trop.* 2009;111:15-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.006>
 25. **Bonfante-Cabarcas R, Rodriguez-Bonfante C, Vielma BO, Garcia D, Saldivia AM, Aldana E, et al.** Seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* infection and associated factors in an endemic area of Venezuela. *Cad Saúde Pública.* 2011;27:1917-29. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2011001000005>
 26. **Crisante G, Rojas A, Teixeira MM, Añez N.** Infected dogs as a risk factor in the transmission of human *Trypanosoma cruzi* infection in western Venezuela. *Acta Trop.* 2006;98:247-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.05.006>
 27. **Rojas ME, Varquez P, Villarreal MF, Velandia C, Vergara L, Moran-Borges YH, et al.** An entomological and seroepidemiological study of Chagas' disease in an area in central-western Venezuela infested with *Triatoma maculata* (Erichson 1848). *Cad Saúde Pública.* 2008;24:2323-33. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008001000013>
 28. **Villa MA.** Aspectos geográficos del estado Sucre. Serie Monografías estatales. Caracas: Corporación Venezolana de Fomento; 1965. p. 1-266.
 29. **Scheaffer R, Mendenhall W, Ott L.** Elementos de muestreo. México. D.F.: Grupo Editorial Iberoamericana; 2006. p.1-321.

30. **Paniz-Mondolfi AE, Pérez-Álvarez AM, Lanza G, Márquez E, Concepción JL.** Amiodarone and itraconazole: A rational therapeutic approach for the treatment of chronic Chagas' disease. *Chemotherapy*. 2009;55:228-33. <http://dx.doi.org/10.1159/000219436>
31. **Fletcher R, Fletcher, S, Wagner E.** Epidemiología clínica. Aspectos fundamentales. 2ª edición. Barcelona: Elsevier Masson; 1998. p. 1-287.
32. **World Health Organization.** Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee. Fecha de consulta: 6 de junio de 2011. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf
33. **Rosypal AC, Tripp S, Kinlaw C, Sharma RN, Stone D, Dubey JP.** Seroprevalence of canine leishmaniasis and American trypanosomiasis in dogs from Grenada, West Indies. *J Parasitol*. 2010;96:228-9. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2238.1>
34. **Graiff D, Zurbriggen G, Aleu G, Sequeira G, Faya M, Marini V, et al.** Seropositividad para *Trypanosoma cruzi* en caninos de la localidad de la Para (Córdoba, Argentina). *InVET*. 2009;11:11-4.
35. **Diosque P, Padilla AM, Cimino RO, Cardozo RM, Negrette OS, Marco JD, et al.** Chagas disease in rural areas of Chaco Province, Argentina: Epidemiologic survey in humans, reservoirs, and vectors. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71:590-3.
36. **Romero M, Sánchez J.** Seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* por la técnica de *Western Blot* en población canina del departamento de Tolima, Colombia. *Vet Zootec*. 2008; 2:48-52.
37. **Hernández JL, Rebollar-Téllez EA, Infante F, Morón A, Castillo A.** Indicators of infestation, colonization and infection of *Triatoma dimidiata* (Latreille) (Hemiptera: Reduviidae) in Campeche, Mexico. *Neotrop Entomol*. 2010;39:1024-31. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2010000600027>
38. **Aguilera K.** Evaluación serológica de *Trypanosoma cruzi* en las comunidades rurales de Cocollar y las Piedras de Cocollar, municipio Montes, estado Sucre (trabajo de pregrado). Cumaná: Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente; 2003.
39. **Berrizbeitia M, Ward BJ, Bubis J, Gottschalk M, Ache A, Perdomo D, et al.** 85-kDa protein of *Trypanosoma cruzi* purified by affinity chromatography used in the multiple antigen binding assay (MABA) for the diagnosis of *T. cruzi* infection in a Venezuelan rural community. *Parasitol Res*. 2010;106:1127-34. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1773-6>
40. **Figuera L.** Estudio seropedidemiológico del mal de Chagas en los municipios Arismendi y Ribero del estado Sucre (trabajo de pregrado). Cumaná: Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre; 2002.
41. **Jiménez-Coello M, Ortega-Pacheco A, Guzmán-Marín E, Guiris-Andrade DM, Martínez-Figueroa L, Acosta-Viana KY.** Stray dogs as reservoirs of the zoonotic agents *Leptospira interrogans*, *Trypanosoma cruzi*, and *Aspergillus* spp. in an urban area of Chiapas in southern Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010;10:135-41. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2008.0170>.
42. **Jiménez-Coello M, Guzmán-Marín E, Ortega-Pacheco A, Acosta-Viana KY.** Serological survey of American trypanosomiasis in dogs and their owners from an urban area of Merida Yucatan, Mexico. *Transbound Emerg Dis*. 2010;57:33-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01130.x>
43. **Solis H, Carvalho E, Ferreira C, Casanova C, Huaman A, Mendoza V.** Contribución al estudio de la epidemiología de la enfermedad de Chagas en tres localidades de la zona sur del Perú. *Ann Fac Med*. 2003;64:223-7.
44. **Albarracín-Veizaga H, de Carvalho ME, Nascimento EM, Rodrigues VL, Casanova C, Barata JM.** Chagas disease in an area of recent occupation in Cochabamba, Bolivia. *Rev Saúde Pública*. 1999;33:230-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101999000300003>
45. **Zeledón R, de Trejos M, Chinchilla M.** Experimental infection of mice with blood, culture and insect forms of *Trypanosoma cruzi* by diferents routes. *Protozoology*. 1977;3:95-105.
46. **Catala SS, Crocco LB, Muñoz A, Morales G, Paulone I, Giraldez E, et al.** Entomological aspects of Chagas' disease transmission in the domestic habitat, Argentina. *Rev Saúde Pública*. 2004;38:216-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102004000200010>
47. **Estrada-Franco JG, Bhatia V, Diaz-Albiter H, Ochoa-García L, Barbabosa A, Vázquez-Chagoyan JC, et al.** Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:624-30. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1204.050450>